



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΝΕΤΙΚΗΣ, ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Ανάπτυξη μεθόδου ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού πρόβειου γάλακτος και
ανίχνευση νοθείας με αγελαδινό γάλα σε τυρί ΦΕΤΑ Π.Ο.Π.**

Κουτσαμανής Χρήστος



Λάρισα, 2015

**Ανάπτυξη μεθόδου ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού πρόβειου γάλακτος και
ανίχνευση νοθείας με αγελαδινό γάλα σε τυρί ΦΕΤΑ Π.Ο.Π.**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ: ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ	ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ:	Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ:	Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1. Το γάλα ως διατροφικό προϊόν.....	10
1.2. Διατροφική αξία του τυριού φέτα	11
2. Επισήμανση και ιχνηλασιμότητα γάλακτος και τυριού φέτα	13
2.1. Γενικά	13
2.1.1 Τυριά Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.) και Προστατευόμενης Γεωγραφικής Ένδειξης (Π.Γ.Ε.).....	13
2.1.2 Προδιαγραφές τυριού Φέτα (Π.Ο.Π).....	18
2.2 Γενικοί κανόνες επισήμανσης τροφίμων	20
2.2.1 Επισήμανση τυριού «ΦΕΤΑ»	21
2.3 Ιχνηλασιμότητα – ανιχνευσιμότητα τροφίμων	22
2.4 Μέθοδοι ταυτοποίησης γαλακτοκομικών προϊόντων	24
2.4.1 Ηλεκτροφορητικές τεχνικές.....	25
2.4.2 Χρωματογραφικές τεχνικές	26
2.4.3 Ανοσολογικές μέθοδοι	27
2.4.4 Τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR)	28
3. Μοριακοί δείκτες.....	32
4. Μιτοχονδριακό DNA	33
4.1 Γενικά.....	33
4.2 Γονίδια που χρησιμοποιούμε για την ταυτοποίηση των ειδών.....	36
4.3 Η επίδραση της φύσης του γονιδίου-στόχου στην Real-Time PCR με βάση την ταυτοποίηση του DNA.....	38
5. Σκοπός της εργασίας.....	39
6. Πειραματική πορεία - Μέθοδοι.....	40
6.1 Δείγματα	40
6.2 Απομόνωση DNA.....	41
6.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης	42
6.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - PCR (Polymerase Chain Reaction)	45
6.5 Real Time PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο).....	53
6.5.1 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς	58
6.5.2 Αναλυτικές μέθοδοι για την Real Time PCR με βάση τις φθορίζουσες χρωστικές ουσίες SYBR Green	61

6.5.3 Υπολογισμοί	63
7. Αποτελέσματα	64
7.1 Απομόνωση DNA	64
7.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	64
7.3 Έλεγχος συγκέντρωσης εκκινητών (Fw, Rv).....	65
7.4 Έλεγχος για διασταυρούμενη αντιδραστικότητα	67
7.5 Έλεγχος χρησιμοποίησης αγελαδινού γάλακτος	67
7.6 Έλεγχος της συγκέντρωσης εκκινητών σε μίγματα	68
7.7 Κατασκευή καμπύλης ποσοτικοποίησης πρόβειου DNA	69
7.8 Ποσοτικοποίηση δειγμάτων DNA από τυρί ΦΕΤΑ και κατσικίσιο τυρί.....	71
8. Συζήτηση.....	73
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	77
Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία	77
Ελληνική Βιβλιογραφία.....	87
Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία - Ιστοσελίδες.	90

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα λόγω της ιδιαίτερα υψηλής διατροφικής αξίας τους, κατέχουν σημαντική θέση στις προτιμήσεις των καταναλωτών σε όλη την διάρκεια της ζωής τους.

Ιδιαίτερα τα προϊόντα Π.Ο.Π. στα οποία ανήκει η ΦΕΤΑ, που έχουν υψηλή προστιθέμενη αξία, έχουν παρατηρηθεί κρούσματα νοθείας με σκοπό το παράνομο κέρδος. Η νοθεία στο τυρί ΦΕΤΑ, αποτελεί σημαντικό ζήτημα για τους καταναλωτές τόσο στην Ελλάδα όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο, γιατί είναι το πιο γνωστό τυρί της πατρίδας μας και έχει ζήτηση σε παγκόσμιο επίπεδο. Έχει σημασία για τους καταναλωτές από οικονομική, θρησκευτική, ηθική, διατροφική και υγιεινή άποψη, για τις επιχειρήσεις για την λειτουργία του υγιούς ανταγωνισμού και τέλος την προστασία και την φήμη του ίδιου του προϊόντος. Για την ορθή ενημέρωση του καταναλωτή έχει θεσπιστεί νομοθετικά η επισήμανση και η ιχνηλασιμότητα των προϊόντων. Γενικότερα όμως έχει διαπιστωθεί ότι απαιτούνται αποτελεσματικές τεχνικές για την ταυτοποίηση των ειδών και των ποσοτήτων του γάλακτος που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή της, τόσο για την προστασία των καταναλωτών, όσο και για τους υπεύθυνους της γαλακτοβιομηχανίας.

Στην παρούσα διατριβή εφαρμόστηκαν μοριακές τεχνικές με χρήση μοριακών δεικτών, για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση τμημάτων πρόβειου DNA και ανίχνευση τμημάτων βόειου DNA σε δείγματα τυριού ΦΕΤΑ και σε κατσικίσιο τυρί. Με την τεχνική αυτή θέλουμε να προσδιορίσουμε αφενός το ποσοστό του πρόβειου γάλακτος και αφετέρου αν χρησιμοποιήθηκε αγελαδινό γάλα κατά την παρασκευή του τυριού ΦΕΤΑ. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο μιτοχονδριακό DNA που απομονώθηκε από δείγματα τυριού ΦΕΤΑ και από κατσικίσιο τυρί. Οι τεχνικές που εφαρμόστηκαν ήταν η PCR και η Real Time PCR. Αρχικά ενισχύθηκε με την μέθοδο PCR τμήμα του γονιδίου 12s rRNA για πρόβειο και έγινε έλεγχος ότι οι συγκεκριμένοι εκκινητές δεν ενισχύουν αλληλουχίες άλλων ειδών ζωικών ειδών. Στην συνέχεια έγινε έλεγχος για να προσδιοριστεί η κατάλληλη συγκέντρωση των εκκινητών, η οποία θα μας έδινε την καλύτερη απόδοση αντίδρασης (Efficiency, E) και για την διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ των ειδών αίγιου, γαλοπούλας, κοτόπουλου, χοιρινού, μοσχαριού, με την μέθοδο της Real Time PCR χρησιμοποιώντας την χρωστική SYBR Green. Τέλος, με την μέθοδο της Real Time PCR με χρήση χρωστικής SYBR Green κατασκευάστηκε καμπύλη ποσοτικοποίησης πρόβειου DNA σε δείγματα και ποσοτικοποιήθηκε το πρόβειο DNA σε δείγματα τυριού ΦΕΤΑ και σε κατσικίσιο τυρί.

Επίσης με την ίδια μέθοδο ελέγχθηκε αν χρησιμοποιήθηκε αγελαδινό γάλα κατά την παρασκευή του τυριού ΦΕΤΑ.

Με την χρήση του γονιδίου 12S rRNA και την μέθοδο Real Time PCR με χρήση χρωστικής SYBR Green είναι εφικτή η δημιουργία καμπύλων αναφοράς για την ποσοτικοποίηση πρόβειου DNA και ανίχνευση ύπαρξης αγελαδινού DNA σε δείγματα τυριού Φέτα και κατσικίσιου τυριού. Η μέθοδος αυτή κρίθηκε ικανή για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση πρόβειου γάλακτος καθώς και την ανίχνευση χρησιμοποίησης αγελαδινού γάλακτος σε τυρί Φέτα, οπότε την καθιστά χρήσιμο εργαλείο για τον έλεγχο της νοθείας σε τυρί Φέτα.

ABSTRACT

Milk and dairy products occupy an important place in the preferences of consumers throughout their lifetime, due to their very high nutritional value.

Especially in the PDO (Protected Denomination of Origin) products that have high added value and in which FETA belongs, fraud cases for the purpose of illegal profit were recorded. The fraud of FETA cheese is an important issue for consumers, both in Greece and worldwide, because of the publicity of cheese in our country and its demand worldwide. FETA is important for consumers out of economic, religious, ethical, nutritional and healthy aspect, for the fair competition of companies and finally the protection and reputation of the product itself. The labeling and traceability of products was legislative established in order to inform consumers properly. Generally it was found, that effective techniques for the identification of species were required in the bulk of milk used in the manufacture, either for consumer protection and the dairy industry managers.

In this study, molecular techniques using molecular markers were applied for the identification and quantification of sheep DNA fragments and detection of bovine DNA fragments in Feta cheese and goat cheese samples. By using this technique the percentage of sheep's milk and cow's milk used in FETA production were determined. Mitochondrial DNA isolated from Feta and goat cheese samples was the target. The techniques used were PCR and Real Time PCR. Firstly, part of the 12s rRNA gene of sheep was amplified with the PCR method and it was checked that these primers do not amplify sequences of other animal species. Then, a check was made using the dye SYBR Green of the Real Time PCR method, in order to determine the appropriate concentration of primers, which would ensure optimal efficiency reaction (Efficiency, E) for the cross-reactivity among goat, turkey, chicken, pig and calf species. Finally, a standard curve for the quantification of sheep DNA was constructed by using the method of the Real Time PCR and sheep DNA in Feta and goat cheese samples was quantified.

Also it was checked if cow milk was used in the manufacture of feta cheese by the same method.

In conclusion, using the 12S rRNA gene as target and Real Time PCR method it is feasible to construct a standard curve for quantifying DNA sheep and to detect cow DNA presence in feta and goat cheese samples. This finding makes it a useful tool for checking the fraud of feta.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Βιολογίας Σπονδυλωτών, κας Αικατερίνης Μούτου. Πρωτίστως να την ευχαριστήσω, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, αναθέτοντάς μου την εκτέλεση αυτής της εργασίας, αλλά επίσης και για την επιστημονική καθοδήγηση, την υποστήριξη, τις εύστοχες υποδείξεις, και τις διορθώσεις ώστε να ολοκληρωθεί αυτή η εργασία. Να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, κ. Ζήση Μαμούρη, που από την αρχή με εμπιστεύτηκε για την όλη πορεία του μεταπτυχιακού προγράμματος, καθώς και την Επ. Καθ. Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών κ. Σαραφίδου Θεολογία, για την συμβολή της στην ολοκλήρωση της παρούσης εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα, τον διδάκτορα κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο, για την πολύτιμη βοήθειά του, το ενδιαφέρον, την προθυμία και τον χρόνο που αφιέρωσε κατά την εκτέλεση του εργαστηριακού μέρους της διατριβής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που επικρατούσε στο εργαστήριο.

Ευχαριστώ τον φίλο μου και συμφοιτητή μου Φωτεινιά Νίκο, με τον οποίο εργαστήκαμε ως μια ομάδα. Η συνεργασία, η αλληλοβοήθεια, η ανταλλαγή απόψεων και η ηθική στήριξη ήταν πολύ εποικοδομητική, ώστε βοήθησε τα μέγιστα για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Τέλος, πολλές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην σύζυγό μου και τα παιδιά μου, που υπήρξαν το στήριγμά μου, για την αμέριστη ηθική στήριξη που μου παρείχαν, για την κατανόηση που επέδειξαν κατά τη διάρκεια των σπουδών μου και πιστεύω πως δεν τους διέψευσα.

Λάρισα, 06/07/2015
Κουτσμαλής Χρήστος

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα καταναλώνονται ευρέως σε παγκόσμιο επίπεδο λόγω της υψηλής διατροφικής τους αξίας και έχουν τεράστια εμπορική σημασία στην βιομηχανία τροφίμων. Το γάλα που χρησιμοποιείται για την παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων προέρχεται από διάφορα ζωικά είδη όπως αγελαδινό, πρόβειο, αίγαιο και βουβαλίσιο. Το τυρί που παράγεται από αγελαδινό γάλα κυριαρχεί σε παγκόσμιο επίπεδο. Ένα μέρος της παγκόσμιας αγοράς καταλαμβάνουν και τα τυριά που παράγονται από γάλα άλλων ειδών ζώων ειδικά στις μεσογειακές χώρες, μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα, που παράγουν υψηλής ποιότητας παραδοσιακά τυριά από αίγαιο, πρόβειο ή βουβαλίσιο γάλα όπως η φέτα, το ροκφόρ, η μοτσαρέλλα και πολλά άλλα.

Η χρησιμοποίηση γάλακτος που προέρχεται από άλλο ζωικό είδος ή σε διαφορετικές αναλογίες από αυτές που ορίζονται από την νομοθεσία για την παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων αποτελεί νοθεία. Συνήθως αναμειγνύονται γάλατα από διαφορετικά είδη ζώων κυρίως για μείωση του κόστους παραγωγής. Αυτού του είδους η νοθεία οδηγεί στην παραγωγή τυριού το οποίο είναι κατώτερο των προσδοκιών του καταναλωτή, σε πλάνη του καταναλωτή και τελικά σε δυσφήμιση του ίδιου του προϊόντος και της επιχείρησης που το παράγει.

Στην Ελλάδα η παραγωγή τυριών αποτελεί ένα δυναμικό κλάδο της βιομηχανίας τροφίμων και αξιοποιεί με βέλτιστο τρόπο τις μεγάλες ποσότητες πρόβειου και αίγειου γάλακτος που παράγονται. Σχεδόν όλη η ποσότητα του αιγοπρόβειου γάλακτος χρησιμοποιείται στην τυροκόμηση. Το σημαντικότερο τυρί που παράγεται στην χώρα μας από άποψη παραγωγής και παράδοσης είναι η Φέτα. Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της εκτιμούνται από τους καταναλωτές σε διεθνές επίπεδο. Σύμφωνα με τις προδιαγραφές που θέτει ο κώδικας τροφίμων και ποτών, παρασκευάζεται από πρόβειο γάλα ή από μίγματά του με αίγαιο με την συμμετοχή του δεύτερου να μην υπερβαίνει το 30%. Ορισμένες φορές μπορεί να έχουμε αύξηση του ποσοστού του αίγειου γάλακτος πάνω από τα νομοθετημένα όρια ή/και προσθήκη αγελαδινού γάλακτος. Οι λόγοι που οι παρασκευαστές ακολουθούν την παραπάνω παράνομη, πλην όμως επικερδή τακτική, είναι η αυξημένη τιμή του πρόβειου γάλακτος σε σύγκριση με τα υπόλοιπα γάλατα ή λόγω της εποχιακής διάθεσής του. Οι παρασκευαστές είναι υποχρεωμένοι από την νομοθεσία να δηλώνουν σε μηνιαία βάση την προέλευση και το είδος γάλακτος που χρησιμοποιούν για την παρασκευή τόσο των τυριών όσο και των άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων που παράγουν. Το αποτέλεσμα της παράνομης προσθήκης ή της αλλαγής των ποσοστών του τυροκομούμενου γάλακτος έχει ως αποτέλεσμα να επηρεαστεί ο χρόνος πήξης με πυτιά, ο ρυθμός σχηματισμού πήγματος, η συνεκτικότητα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του παραγόμενου τυριού. Κάποιοι καταναλωτές αποφεύγουν το αγελαδινό γάλα για λόγους υγείας (μη ανεκτικότητα, δυσανεξία ή αλλεργία) (Haza et al. 1999, Sampson 2003), θρησκευτικούς, ηθικούς ή ακόμα και διαφορετικής κουλτούρας (Shatenstein & Ghadirian 1998).

Επομένως αποτελεί αναγκαιότητα η δυνατότητα της ακριβούς εκτίμησης των ζωικών ειδών γάλακτος που χρησιμοποιούνται κατά την παρασκευή των γαλακτοκομικών προϊόντων, κυρίως για τα υψηλής ποιότητας τυριά που παρασκευάζονται αποκλειστικά από πρόβειο, αίγαιο γάλα ή και μίγματά του, πολλά από τα οποία έχουν χαρακτηριστεί ως Προϊόντα Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.) από τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό.

1.1. Το γάλα ως διατροφικό προϊόν

Με τον όρο γάλα εννοούμε το έκκριμα του μαστικού αδένος των θηλαστικών, που προορίζεται για τη διατροφή του νεογέννητου για το οποίο αποτελεί τη μοναδική τροφή μέχρι μία ορισμένη ηλικία. Παρουσιάζει σημαντικές διαφορές στην εκατοστιαία αναλογία των συστατικών που περιέχει, ανάλογα με το είδος του ζώου, τα κύρια όμως συστατικά είναι ίδια για όλα τα είδη γάλακτος και αποτελούνται από λίπη, πρωτεΐνες, σάκχαρο (λακτόζη) και ανόργανα άλατα. Όλα τα συστατικά του γάλακτος είναι διαλυμένα ή εναιωρημένα στο νερό. Για τον άνθρωπο, το γάλα εξακολουθεί να αποτελεί μέρος της καθημερινής διαίτας του είτε αυτούσιο είτε με τη μορφή γαλακτοκομικών προϊόντων για όλη τη διάρκεια ζωής του.

Η χημική σύσταση του γάλακτος είναι (Jenness 1974, Ανυφαντάκης 2004, Waistra 2006, Ebing 2006):

1. Νερό: Είναι το συστατικό με την μεγαλύτερη αναλογία (80 έως 88%) ανάλογα με το είδος του ζώου.
2. Λίπος: Το λίπος είναι μορφοποιημένο σε λιποσφαίρια. Το δεσπόζων συστατικό (98%) της λιπαρής φάσης του αποτελείται από μίγμα τριγλυκερίδιων, διγλυκερίδιων και μονογλυκερίδιων. Τα υπόλοιπα συστατικά της λιπαρής φάσης είναι φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια, σφιγγολιπίδια, στερόλες (χοληστερόλη και εστέρες της), καροτένια και λιποδιαλυτές βιταμίνες.
3. Πρωτεΐνες: Οι πρωτεΐνες του γάλακτος αποτελούν το μεγαλύτερο κομμάτι των αζωτούχων ουσιών (περίπου 95%). Χωρίζονται δε στην καζεΐνη, (α_{s1} -, α_{s2} -, β -, κ - και γ -καζεΐνη) που απαντά σε μεγάλη αναλογία, και στις πρωτεΐνες του ορού (α -λακταλβουμίνη, β -λακτοσφαιρίνη, οροαλβουμίνη, ανοσοσφαιρίνες). Το μη πρωτεϊνικό κλάσμα του γάλακτος αποτελείται από πεπτίδια, αμινοξέα, ουρία, αμμωνία, κρεατίνη, κρεατινίνη, ουρικό οξύ, οροτικό οξύ και ιππουρικό οξύ.
4. Υδατάνθρακες: Το κύριο σάκχαρο του γάλακτος των θηλαστικών είναι ο δισακχαρίτης λακτόζη, που αποτελείται από την D-λακτόζη και την D-γαλακτόζη και από μικρές ποσότητες μονοσακχαριτών, ουδέτερους ή όξινους πολυσακχαρίτες καθώς και σάκχαρα δεσμευμένα με πρωτεΐνες ή πεπτίδια (Reineccius et al. 1979, Johnson 1974).
5. Άλατα: Περιέχει αρκετά μεταλλικά στοιχεία σε ιοντική μορφή, δεσμευμένα σε άλλα συστατικά και με μορφή ιοντικών ή ανόργανων αλάτων τα κυριότερα από τα οποία είναι: K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , CO_3 , SO_4^{2-} , PO_4 , $CaCl$, Mg^{2+} , Cl^- , Ca Citrate $^-$, $RCOO^-$, HPO_4^{2-} , $H_2PO_4^-$, KCl , $NaCl$, $CaHPO_4$.
6. Ιχνοστοιχεία: Το γάλα θεωρείται πλούσια πηγή ιχνοστοιχείων που βρίσκονται με μορφή οργανικών ενώσεων, στην μεμβράνη των λιποσφαιρίων και ως συστατικό των βιταμινών (βρώμιο, κοβάλτιο, χαλκός, φθόριο, ιώδιο, σίδηρος, μαγγάνιο, μολυβδαίνιο, σελήνιο, πυρίτιο, ψευδάργυρος κ.α.).
7. Βιταμίνες: Περιέχει σχεδόν όλες τις βιταμίνες άλλες σε ικανοποιητική ποσότητα και άλλες σε ίχνη (A, B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₁₂, C, D, E, K).
8. Ένζυμα: Παράγονται από τα κύτταρα του μαστού. Στο γάλα μπορούμε να βρούμε: αλκαλική φωσφατάση, οξειδάση της ξανθίνης, σουλφιδρυλική οξειδάση, καταλάση, λακτοϋπεροξειδάση, υπεροξειδάση της δισμουτάσης, λιποπρωτεϊνική λιπάση, ριβονουκλεάση, πλασμίνη, πρωτεάσες, υπεροξειδάση, λυσοζύμη.
9. Άλλα συστατικά: Στο γάλα ανευρίσκονται οργανικά οξέα, ορμόνες (προλακτίνη, σωματοτροπίνη και στεροειδή), καρβονυλικές ενώσεις (αλδεΐδες και κετόνες),

εστέρες θειικού οξέος, αέρια (CO₂, N, O₂), σωματικά κύτταρα και ριβονουκλεϊκά οξέα.

Η χημική σύσταση του γάλακτος που αναφέρεται στον Πίνακα 1 επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες οι κυριότεροι από τους οποίους είναι το είδος, η φυλή, το στάδιο της γαλακτικής περιόδου, η διατροφή, οι ασθένειες των μαστών, η ηλικία, η θρεπτική κατάσταση, το σωματικό βάρος, η εποχή και η θερμοκρασία του έτους (Jenness 1974, Κατσαούνης 1979).

Το γάλα του προβάτου είναι πλουσιότερο σε στερεά συστατικά από το γάλα της αγελάδας και της αίγας αλλά η χημική σύστασή του παρουσιάζει διακυμάνσεις ανάλογα με τη φυλή, κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου και τη διατροφή. Συγκριτικά με το γάλα της αγελάδας και της αίγας χαρακτηρίζεται από υψηλότερα ποσοστά περιεκτικότητας σε λίπος και πρωτεΐνη, γεγονός που το καθιστά καταλληλότερο για τυροκόμηση, γιατί η πρωτεΐνη είναι κυρίως υπεύθυνη για την ποσότητα του τυριού που θα παραχθεί (Casu & Marcialis 1966), και το λίπος επηρεάζει τόσο την ποσότητα των τυριών όσο και τις οργανοληπτικές τους ιδιότητες (Pulina 2004). Υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης, λίπους και ολικών στερεών στο γάλα είναι θετικά συσχετισμένες ιδιότητες με υψηλές ποσότητες τυροκομικών προϊόντων (Charman 1981, Storry et al. 1983). Ως εκ τούτου το πρόβειο γάλα παράγει μεγαλύτερες ποσότητες τυριών καθώς παρουσιάζει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα ανωτέρω προαναφερθέντα χαρακτηριστικά, από το αίγιο και το αγελαδινό γάλα (Casu & Marcialis 1966, Anifantakis 1986, 1990, 2004).

Πίνακας 1. Μέση χημική σύσταση γάλακτος αγελάδας, προβάτου και αίγας*

Χημική σύσταση	Αγελάδα (<i>Bos taurus</i>)	Πρόβατο (<i>Ovis aries</i>)	Αίγα (<i>Capra hircus</i>)
Ενέργεια (kcal/100g)	62	105	71
Νερό (%)	87,0	82,5	87,5
Ξηρή ουσία (% w/w)	12,8	18,6	13,3
Λίπος (% w/w)	3,7	7,5	4,5
Ολικές αζωτούχες ουσίες (% w/w)	3,3	5,3	3,6
Καζεΐνη (% w/w)	2,7	4,5	3,0
Πρωτεΐνη ορού (% w/w)	0,6	0,8	0,6
Υδατάνθρακες (% w/w)	4,6	4,6	4,3
Ασβέστιο (% w/w)	0,1	0,2	0,1
Τέφρα (% w/w)	0,7	1,0	0,8
Πυκνότητα	1,032	1,037	1,032
Οξύτητα (°sh)	8,0	8,5	7,1
pH	6,60	6,65	6,5
Σημείο Πήξεως (°C)	-0,570	-0,850	-0,524

*Walstra 2006, Ebing 2006, Pulina 2004

1.2. Διατροφική αξία του τυριού φέτα

Αποτελεί σημαντικό τμήμα του διαιτολογίου μας, καθώς κάθε Έλληνας καταναλώνει περισσότερα από δέκα κιλά τυρί φέτα το χρόνο, κάτι που δεν συμβαίνει με κανένα άλλο τυρί στον κόσμο.

Ως τρόφιμο είναι εύπεπτο και άριστης θρεπτικής αξίας. Τα κύρια θρεπτικά συστατικά της εμφανίζονται στον Πίνακα 2. Είναι πλούσιο σε υψηλής βιολογικής αξίας

λευκώματα αφού περιέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα. Στα πρώτα στάδια ωρίμανσης του τυριού δε παρατηρείται έντονη πρωτεόλυση των καζεϊνών, οι οποίες μένουν αδιάλυτες στο νερό. Καθώς προχωράει η ωρίμανση του τυριού μέρος των καζεϊνών μετατρέπεται με την επίδραση των ενζύμων σε απλούστερα συστατικά όπως πολυπεπτίδια, ολιγοπεπτίδια, αμινοξέα, αμμωνία, αμίνες που είναι πολύ πιο εύπεπτα.

Πίνακας 2. Κύρια θρεπτικά συστατικά της φέτας/100 g κατά μέσο όρο

Συστατικά	Ποσότητα/100 g
Ενέργεια (Kcal)	250
Νερό (g)	56,5
Πρωτεΐνη (g)	15,6
Ολικά Λιπίδια (g)	20.2
Κορεσμένα Λιπαρά οξέα (g)	13,7
Μονοακόρεστα (g)	4,1
Πολυακόρεστα (g)	0,6
Ασβέστιο (mg)	360
Βιταμίνη D (μg)	0,4
Βιταμίνη A (μg)	250
Βιταμίνη B ₂ (μg)	0,75
Μαγνήσιο (mg)	20
Φώσφορος (mg)	280
Κάλιο (mg)	95
Νάτριο (mg)	1440
Χοληστερόλη (mg)	70

Η φέτα είναι από τα τυριά με τα χαμηλότερα λιπαρά, περίπου 20%. Η μερίδα των 60 g φέτας περιέχει 12,12 g λίπους εκ των οποίων τα 8,22 είναι κορεσμένα. Παρόλο όμως που ανήκει στην κατηγορία των χαμηλότερων σε λιπαρά τυριών, η Ελληνική Διαβητολογική Εταιρία (ΕΔΕ) συστήνει στους διαβητικούς να περιορίζονται οι μεγάλες ποσότητες φέτας και να προτιμώνται τα λευκά τυριά με ακόμη λιγότερα λιπαρά. Η συγκέντρωση της χοληστερόλης στο λίπος των γαλακτοκομικών προϊόντων εξαρτάται τόσο από το είδος του ζώου που προέρχεται το γάλα (γίδινο, πρόβειο) όσο και από τις τεχνολογικές επεμβάσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την παραγωγή των γαλακτοκομικών προϊόντων.

Περιέχει σημαντική ποσότητα ασβεστίου, δομικού συστατικού των οστών και μαζί με την βιταμίνη D, που επίσης είναι απαραίτητη για τη σκελετική ανάπτυξη. Από τις βιταμίνες του γάλακτος οι λιποδιαλυτές A, και E μεταφέρονται στο τυρί κατά την τυροκόμηση, σε ποσοστό 80-85% και 30% αντίστοιχα. Αντίθετα, οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες μεταφέρονται στο τυρί σε σημαντικά μικρότερο ποσοστό και μάλιστα διαφορετικό ανά βιταμίνη.

Επιπλέον, καλό είναι να πλένεται πριν καταναλωθεί, ώστε να αφαιρείται το Νάτριο από την άλμη. Η μερίδα της φέτας έχει 864 mg Νατρίου τη στιγμή που μια μέτρια ανάλατη δίαιτα επιτρέπει 1000-2000 mg Νατρίου ημερησίως. Εκείνοι που έχουν αυξημένη αρτηριακή πίεση θα πρέπει να είναι ιδιαίτερα προσεκτικοί με τις ποσότητες φέτας που καταναλώνουν.

Γενικότερα 100 γραμμάρια φέτας μπορούν να ικανοποιήσουν τις ημερήσιες ανάγκες ενός μέτρια εργαζόμενου άνδρα κατά το 1/3 ως προς πρωτεΐνες, βιταμίνη A και ριβοφλαβίνη και κατά το μισό ανάγκες του σε ασβέστιο. Καλύπτουν επίσης ένα μέρος των ημερήσιων αναγκών του σε ενέργεια.

2. Επισήμανση και ιχνηλασιμότητα γάλακτος και τυριού φέτα

2.1. Γενικά

Σε ευρωπαϊκό και παγκόσμιο επίπεδο έχει νομοθετηθεί η παρακολούθηση της τροφικής αλυσίδας για την εξασφάλιση της υγιεινής και της ασφάλειας των τροφίμων που καταναλώνει ο άνθρωπος. Η νομοθεσία επικαιροποιείται συνεχώς με σκοπό την πρόληψη της εκδήλωσης διατροφικής κρίσης. Ο τομέας της παραγωγής γάλακτος αποτελεί σημαντικό μέρος της γεωργικής παραγωγής και παράλληλα τροφοδοτεί με πρώτη ύλη πολλές επιχειρήσεις επεξεργασίας γάλακτος και παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων. Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι πηγή υψηλής ποιότητας θρεπτικών συστατικών και καλύπτουν σημαντικό μέρος των διατροφικών αναγκών του ανθρώπου. Ωστόσο, δεν λείπουν οι περιπτώσεις όπου επιχειρήσεις εν γνώση τους διαπράττουν νοθείες, εξαπατούν τον καταναλωτή ενώ παράλληλα ασκείται αθέμιτος ανταγωνισμός μεταξύ ομοειδών επιχειρήσεων, με αποτέλεσμα την παραγωγή μη ασφαλών προϊόντων, την κερδοσκοπία σε βάρος της υγείας των καταναλωτών και σε βάρος του υγιούς ανταγωνισμού.

2.1.1 Τυριά Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.) και Προστατευόμενης Γεωγραφικής Ένδειξης (Π.Γ.Ε.)

Τις τελευταίες δεκαετίες όλο και πιο έντονα παρατηρούνται τάσεις ομογενοποίησης της διεθνούς αγοράς, αγαθών και υπηρεσιών. Προς αυτή την κατεύθυνση συμβάλλει η παγκοσμιοποίηση. Ταυτόχρονα όμως, υπάρχει ένα σύνολο αγροτικών προϊόντων που «αντιστέκεται» για διάφορους λόγους σε αυτή την εξέλιξη και το καθένα ξεχωριστά έχει διατηρήσει τα επιμέρους ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του. Στις μέρες μας, στα πλαίσια της ευρύτερης παγκοσμιοποίησης και της ελεύθερης διακίνησης των αγαθών, διακρίνονται δύο μεγάλες κατηγορίες αγροτικών προϊόντων: τα ομοιογενή, κατά κύριο λόγο κοινά και χωρίς ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και αυτά που διακρίνονται για κάποια ιδιαίτερα ή/και μοναδικά χαρακτηριστικά που εμπεριέχουν. Τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται μια αυξανόμενη ζήτηση για διαφοροποιημένα προϊόντα. Σε αυτή την κατηγορία προϊόντων συμπεριλαμβάνονται, κατά κανόνα ποιοτικά προϊόντα όπως είναι τα βιολογικά προϊόντα, προϊόντα με ιδιαίτερη διατροφική αξία, αλλά και τα προϊόντα προέλευσης.

Η Ευρωπαϊκή Ένωση εκτιμώντας ότι η ποιότητα και η πολυμορφία της γεωργικής παραγωγής συνιστούν ανταγωνιστικό πλεονέκτημα για τους παραγωγούς, το γεγονός ότι οι καταναλωτές ολοένα και περισσότερο ζητούν προϊόντα ποιότητας και παραδοσιακά προϊόντα με αποτέλεσμα την αυξημένη ζήτηση τροφίμων με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που συνδέονται με την γεωγραφική τους προέλευση, ότι οι παραγωγοί μπορούν να εξακολουθήσουν να παράγουν μεγάλο φάσμα ποιοτικών αγροτικών προϊόντων μόνο αν λαμβάνουν δίκαιη αμοιβή για τον κόπο τους, ότι οι παραγωγοί να μπορούν να γνωστοποιούν στους καταναλωτές τα χαρακτηριστικά του προϊόντος τους και ότι πρέπει να παρέχονται στους παραγωγούς τα εργαλεία για την καλύτερη ταυτοποίηση και προώθηση των προϊόντων που διαθέτουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά προστατεύοντάς τους

από αθέμιτες πρακτικές, εξέδωσε τον **Κανονισμό (ΕΕ) αριθ. 1151/2012** «για τα συστήματα ποιότητας των γεωργικών προϊόντων και τροφίμων», ο οποίος κατάργησε και αντικατέστησε τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 509/2006 και τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 510/2006. Ο **Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 664/2014** «όσο αφορά τον καθορισμό των ενωσιακών συμβόλων για τις προστατευόμενες ονομασίες προέλευσης, τις προστατευόμενες γεωγραφικές ενδείξεις και τα εγγυημένα παραδοσιακά ιδιότυπα προϊόντα και όσον αφορά ορισμένους κανόνες σχετικά με την προέλευση, ορισμένους διαδικαστικούς κανόνες και ορισμένες πρόσθετες μεταβατικές διατάξεις» και ο **Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 665/2014** «όσον αφορά τους όρους χρήσης της προαιρετικής ένδειξης ποιότητας 'προϊόν ορεινής παραγωγής'» συμπλήρωσαν τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1151/2012. Τελευταίος εκδόθηκε ο **Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 668/2014** «για τη θέσπιση κανόνων εφαρμογής του Κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 1151/2012 για τα συστήματα ποιότητας των γεωργικών προϊόντων και τροφίμων».

Οι στόχοι του Κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 1151/2012 είναι οι παραγωγοί γεωργικών προϊόντων και τροφίμων να γνωστοποιούν τα χαρακτηριστικά του προϊόντος σε καταναλωτές, να διατίθενται αξιόπιστες πληροφορίες στους καταναλωτές σχετικά με τα προϊόντα, να γίνονται σεβαστά τα δικαιώματα πνευματικής ιδιοκτησίας και να συμβάλλει στην συνοχή της εσωτερικής αγοράς. Ο Κανονισμός επίσης προβλέπει συστήματα ποιότητας που παρέχουν τη βάση για την ταυτοποίηση και προστασία ονομασιών και ενδείξεων που δηλώνουν τα γεωργικά προϊόντα με χαρακτηριστικά που προσδίνουν αξία ή στοιχεία που προσδίνουν αξία λόγω των μεθόδων γεωργικής παραγωγής ή μεταποίησης που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή τους ή του τρόπου παραγωγής ή εμπορίας τους. Θεσπίζει σύστημα προστατευόμενων ονομασιών προέλευσης και γεωγραφικών ενδείξεων ώστε να βοηθηθούν οι παραγωγοί με την εξασφάλιση δίκαιων αποδόσεων ανάλογα με την ποιότητα των προϊόντων, την εξασφάλιση ενιαίας προστασίας των ονομασιών ως δικαιώματος πνευματικής ιδιοκτησίας και με την παροχή σαφούς ενημέρωσης στους καταναλωτές για τα στοιχεία του προϊόντος τα οποία του προσδίδουν αξία.

Ονομασία προέλευσης λέγεται η ονομασία που ταυτοποιεί ένα προϊόν το οποίο κατάγεται από συγκεκριμένο τόπο, περιοχή ή χώρα, του οποίου η ποιότητα ή τα χαρακτηριστικά οφείλονται κυρίως ή αποκλειστικά στο ιδιαίτερο γεωγραφικό περιβάλλον και όλα τα στάδια παραγωγής γίνονται εντός της οριοθετημένης γεωγραφικής περιοχής.

Γεωγραφική ένδειξη λέγεται η ονομασία που ταυτοποιεί ένα προϊόν το οποίο κατάγεται από συγκεκριμένο τόπο, περιοχή ή χώρα, του οποίου ένα συγκεκριμένο ποιοτικό χαρακτηριστικό, μπορεί να αποδοθεί κυρίως στη γεωγραφική του προέλευση και του οποίου ένα τουλάχιστο από τα στάδια της παραγωγής εκτελείται εντός της οριοθετημένης γεωγραφικής περιοχής.

Η προστατευόμενη ονομασία προέλευσης ή η προστατευόμενη γεωγραφική ένδειξη είναι σύμφωνη με προδιαγραφές οι οποίες περιλαμβάνουν τουλάχιστο:

- i. την ονομασία που πρέπει να προστατεύεται ως ονομασία προέλευσης ή γεωγραφική ένδειξη
- ii. περιγραφή του προϊόντος, συμπεριλαμβανομένων των πρώτων υλών καθώς και των κύριων φυσικών, χημικών, μικροβιολογικών ή οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του
- iii. τον καθορισμό της γεωγραφικής περιοχής που οριοθετείται
- iv. στοιχεία που αποδεικνύουν ότι το προϊόν προέρχεται από την οριοθετημένη γεωγραφική περιοχή
- v. περιγραφή της μεθόδου παραγωγής του προϊόντος και των γνήσιων και πάγιων τοπικών μεθόδων, καθώς και πληροφορίες σχετικά με τη συσκευασία, εφόσον το

αποφασίσει η αιτούσα ομάδα και αιτιολογήσει επαρκώς γιατί το συγκεκριμένο προϊόν πρέπει να συσκευάζεται εντός της οριοθετημένης γεωγραφικής περιοχής, προκειμένου να διασφαλισθεί η ποιότητα, η καταγωγή ή ο έλεγχος, ιδίως όσον αφορά την ελεύθερη κυκλοφορία των αγαθών και την ελεύθερη παροχή των υπηρεσιών

- vi. λεπτομέρειες που αποδεικνύουν τον δεσμό μεταξύ της ποιότητας ή των χαρακτηριστικών του προϊόντος και του γεωγραφικού περιβάλλοντος ή τον δεσμό μεταξύ δεδομένης ποιότητας, της φήμης ή άλλου χαρακτηριστικού του προϊόντος και της γεωγραφικής προέλευσης
- vii. το όνομα και τη διεύθυνση των αρχών ή των οργανισμών που ελέγχουν την τήρηση των διατάξεων των προδιαγραφών προϊόντος
- viii. τυχόν ειδικούς κανόνες επισήμανσης σχετικά με το συγκεκριμένο προϊόν.

Ο Κανονισμός (ΕΕ) αρ. 668/2014 καθορίζει ότι στις προδιαγραφές ενός προϊόντος Π.Ο.Π. ή Π.Γ.Ε. προσδιορίζονται οι διαδικασίες που πρέπει να εφαρμόσουν οι επιχειρήσεις όσο αφορά την απόδειξη της προέλευσης του προϊόντος, των πρώτων υλών, των ζωοτροφών και των άλλων συστατικών που απαιτείται να προέρχονται από την οριοθετημένη περιοχή. Έτσι οι επιχειρήσεις πρέπει να είναι ικανές να μπορούν να προσδιορίσουν:

1. τον προμηθευτή, την ποσότητα και την προέλευση όλων των παρτίδων της πρώτης ύλης ή / και των προϊόντων που προμηθεύονται,
2. τον αποδέκτη, την ποσότητα και τον προορισμό των προϊόντων που προμηθεύουν
3. τη σχέση μεταξύ κάθε παρτίδας εισροών και κάθε παρτίδας εκροών.

Ο ίδιος Κανονισμός επίσης καθορίζει τη χρήση συμβόλων και ενδείξεων (χρώματα, τύπος γραμματοσειράς και μέγεθος) που πρέπει να φέρουν τα προϊόντα Π.Ο.Π., Π.Γ.Ε. και Ε.Π.Ι.Π. (Εγγυημένο Παραδοσιακό Ιδιότυπο Προϊόν) όπως φαίνονται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1. Σύμβολα για τα προϊόντα Π.Ο.Π., Π.Γ.Ε., και Ε.Π.Ι.Π. σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΕ) αριθ. 668/2014.

Ο Κανονισμός 1151/2012 επίσης νομοθετεί τον ορισμό μίας ή περισσότερων αρμόδιων αρχών για την διενέργεια επίσημων ελέγχων για να διαπιστωθεί η συμμόρφωση με τις νομικές απαιτήσεις των συστημάτων ποιότητας. Η αρμόδια αρχή μπορεί να αναθέσει σε έναν ή περισσότερους διαπιστευμένους οργανισμούς ελέγχου συγκεκριμένα καθήκοντα που συνδέονται με τους επίσημους ελέγχους των συστημάτων ποιότητας. Στην χώρα μας ορίστηκαν ως αρμόδιες αρχές η Διεύθυνση Βιολογικής Γεωργίας (Τμήμα ΠΟΠ-ΠΓΕ και ΕΠΠΕ) του Υπουργείου Παραγωγικής Ανασυγκρότησης Περιβάλλοντος και Ενέργειας, ο Οργανισμός Πιστοποίησης και Επίβλεψης Γεωργικών

Προϊόντων (Ο.Π.Ε.ΓΕ.Π.), που φέρει το διακριτικό τίτλο AGROCERT και οι Διευθύνσεις Αγροτικής Ανάπτυξης των Περιφερειακών Ενοτήτων της χώρας.

Ο έλεγχος και η πιστοποίηση των Προϊόντων Ονομασίας Προέλευσης και των Προϊόντων Γεωγραφικής Ένδειξης, έχει ανατεθεί, σύμφωνα με την ΚΥΑ 261611/22-03-2007 (ΦΕΚ 406/Β/22-03-2007) όπως τροποποιήθηκε με την ΚΥΑ 290398 (ΦΕΚ 694/Β/2006), στον Οργανισμό Πιστοποίησης και Επίβλεψης Γεωργικών Προϊόντων (ΟΠΕΓΕΠ) με διακριτικό τίτλο AGROCERT. Είναι Νομικό Πρόσωπο Ιδιωτικού Δικαίου του Υπουργείου Παραγωγικής Ανασυγκρότησης Περιβάλλοντος και Ενέργειας που λειτουργεί χάριν του δημοσίου συμφέροντος. Με την ΚΥΑ 188763/13-10-2011 (ΦΕΚ 2284/Β/13-10-2011) ιδρύεται Νομικό Πρόσωπο Ιδιωτικού Δικαίου με την επωνυμία «ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ ΓΕΩΡΓΙΚΟΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ – ΔΗΜΗΤΡΑ», το οποίο ανήκει στον ευρύτερο Δημόσιο Τομέα, λειτουργεί χάριν του δημοσίου συμφέροντος και εποπτεύεται από το Υπουργείο Παραγωγικής Ανασυγκρότησης Περιβάλλοντος και Ενέργειας. Στο παραπάνω Ν.Π.Ι.Δ. συγχωνεύονται το Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε), ο Οργανισμός Γεωργικής Επαγγελματικής Εκπαίδευσης, Κατάρτισης και Απασχόλησης (ΟΓΕΕΚΑ) – «ΔΗΜΗΤΡΑ», ο Οργανισμός Πιστοποίησης και Επίβλεψης Γεωργικών Προϊόντων (Ο.Π.Ε.ΓΕ.Π – AGROCERT) και ο Ελληνικός Οργανισμός Γάλακτος και Κρέατος (ΕΛ.Ο.ΓΑΚ).

Ο Ο.Π.Ε.ΓΕ.Π., που φέρει το διακριτικό τίτλο AGROCERT και είναι αρμόδιος για την διεξαγωγή των ελέγχων, ελέγχει την τήρηση και διασφάλιση των προδιαγραφών, πιστοποιεί τα εν λόγω προϊόντα και εγκρίνει τη χρήση των καταχωρισμένων ονομασιών, των ενδείξεων ΠΟΠ–ΠΓΕ, του κοινοτικού συμβόλου καθώς και της σήμανσης πιστοποίησης του ΟΠΕΓΕΠ (Εικόνα 2), χορηγεί τους κωδικούς αριθμούς συσκευασίας στις ενδιαφερόμενες εγκεκριμένες επιχειρήσεις που συσκευάζουν προϊόντα ΠΟΠ ή/και ΠΓΕ, καταρτίζει, τηρεί και δημοσιοποιεί το «Μητρώο Εγκεκριμένων Επιχειρήσεων» και το «Μητρώο Δικαιούχων Χρήσης των Ενδείξεων ΠΟΠ και ΠΓΕ», ελέγχει στα σημεία χονδρικής και λιανικής πώλησης ή και διάθεσης, την ορθή χρήση της καταχωρισμένης ονομασίας, των ενδείξεων ΠΟΠ και ΠΓΕ, του κοινοτικού συμβόλου καθώς και της σήμανσης πιστοποίησης, που φέρουν τα προϊόντα.



Εικόνα 2. Σήματα πιστοποίησης AGROCERT.

Ο ΕΛ.Ο.ΓΑ.Κ. ιδρύθηκε με τον Νόμο 2127/93 ως ΕΛ.Ο.Γ. (Ελληνικός Οργανισμός Γάλακτος) μετατράπηκε με τον Ν. 3698/2008 σε ΕΛ.Ο.ΓΑ.Κ. (Ελληνικός Οργανισμός Γάλακτος & Κρέατος). Μεταξύ των αρμοδιοτήτων του ΕΛ.Ο.ΓΑ.Κ. είναι ο έλεγχος της

ποιότητας του αγελαδινού, πρόβειου και γίδινου γάλακτος σύμφωνα με την νομοθεσία και ο έλεγχος των «ισοζυγίων γάλακτος» όλων των μονάδων μεταποίησης και εμπορίας γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων για τη νόμιμη χρήση όλων των ειδών γάλακτος ως πρώτη ύλη. Σύμφωνα με την ΚΥΑ 175180/2011 (ΦΕΚ 1721/Β/2-8-2011) όλοι οι αγοραστές γάλακτος, οι μονάδες μεταποίησης, ή/και εμπορίας του γάλακτος, οι μονάδες τυποποίησης – συσκευασίας γαλακτοκομικών προϊόντων καθώς και οι παραγωγοί – κτηνοτρόφοι που μεταποιούν το γάλα της κτηνοτροφικής τους εκμετάλλευσης είναι υποχρεωμένοι:

- i. να αποστέλλουν στον ΕΛ.Ο.ΓΑ.Κ. κάθε μήνα τη μηνιαία δήλωση ισοζυγίου γάλακτος όπου καταχωρούνται όλες οι ποσότητες γάλακτος ανά είδος ζώου που παραλήφθηκαν εγχώριο, από χώρες της Ένωσης ή τρίτες χώρες, με λεπτομερή περιγραφή της μορφής της διακινούμενης πρώτης ύλης.
- ii. όλα τα παραγόμενα προϊόντα από επεξεργασία γάλακτος του μηνός, αναλυτικά κατά κατηγορία και ποσότητα. Στις περιπτώσεις που στην επισήμανση, παρουσίαση και διαφήμιση των τελικών προϊόντων έχει γίνει επίκληση συγκεκριμένης γεωγραφικής προέλευσης θα πρέπει υποχρεωτικά να τηρείται σχετική τεκμηρίωση από την οποία να είναι δυνατή η συσχέτιση της πρώτης ύλης με τα συγκεκριμένα τελικά προϊόντα.
- iii. όλες οι ποσότητες πρώτων υλών ή ημικατεργασμένων προϊόντων με την ακριβή ονομασία και σύνθεσή τους που διατίθεται σε τρίτους.
- iv. όλες οι ποσότητες υποπροϊόντων που παρήχθησαν ή παραλήφθηκαν από άλλους ή παραδόθηκαν σε τρίτους.

Η επισήμανση των προϊόντων Π.Ο.Π. και Π.Γ.Ε. περιλαμβάνει τη καταχωρισμένη ονομασία υποχρεωτικά στην ελληνική γλώσσα, το Σήμα του ΟΠΕΓΕΠ, τους κωδικούς αριθμούς συσκευασίας, που αποτελούνται από τα δύο αρχικά γράμματα της καταχωρισμένης ονομασίας, ακολουθούμενα από τον αύξοντα αριθμό της ετικέτας και τους δύο τελευταίους αριθμούς του έτους παραγωγής, οι οποίοι χορηγούνται από τον ΟΠΕΓΕΠ και τα στοιχεία του παραγωγού ή και συσκευαστή (επωνυμία και διεύθυνση). Τα στοιχεία αυτά αναγράφονται και στην περίπτωση παραγωγής προϊόντων με υπερεργολαβία (φασόν).

Η Φέτα έχει αναγνωριστεί ως Προϊόν Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π) ύστερα από πολλές διαδικασίες. Η Φέτα, ως Π.Ο.Π. κατοχυρώθηκε, σε εθνικό επίπεδο το 1994 (ΦΕΚ 8/Β/11-1- 1994), ενώ το 1996, στα πλαίσια του Κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2081/92, με τον Κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 1107/96 κατοχυρώθηκε σε Κοινοτικό επίπεδο. Κατόπιν προσφυγής άλλων κρατών – μελών, με τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1070/99, η Φέτα διαγράφηκε από το Κοινοτικό μητρώο ΠΟΠ και ΠΓΕ. Στη συνέχεια και με εντολή του Δικαστηρίου των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή, προκειμένου να αξιολογήσει την κατάσταση, πραγματοποίησε αναλυτική έρευνα στα κράτη – μέλη σχετικά με την παραγωγή, την κατανάλωση και τη γνώση των καταναλωτών της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την ονομασία Φέτα. Με βάση τα συμπεράσματα της συγκεκριμένης έρευνας και τη σύμφωνη γνώμη της επιστημονικής επιτροπής, η οποία συμβουλεύει την Ευρωπαϊκή Επιτροπή στο έργο της, η Φέτα, με τον ΚΑΝ.(ΕΚ) 1829/2002, επανακαταχωρίστηκε στο Κοινοτικό μητρώο ΠΟΠ και ΠΓΕ ως Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης. Ακολούθησαν νέες προσφυγές κατά της Ευρωπαϊκής Επιτροπής. Τελικά, στις 25 Οκτωβρίου 2005, το Δικαστήριο των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων εξέδωσε απόφαση με την οποία δικαιώνει την Ευρωπαϊκή Επιτροπή για την επανακαταχώρηση της Φέτας στο

<http://curia.europa.eu/juris/showPdf.jsf?jsessionid=9ea7d2dc30db4edead5224454efba38b914777331e5e.e34KaxiLc3gMb40Rch0SaxqTc390?text=&docid=60654&pageIndex=0&doclang=EL&mode=doc&dir=&occ=first&part=1&cid=25775>. Σύμφωνα με την εθνική και Κοινοτική νομοθεσία (Κανονισμός 1829/2002) που ισχύει, η ονομασία Φέτα είναι προϊόν ΠΟΠ και χρησιμοποιείται αποκλειστικά για το τυρί που παράγεται με παραδοσιακό τρόπο την Ελλάδα, στην οριοθετημένη γεωγραφική περιοχή που αποτελείται από την ηπειρωτική χώρα και το νομό Λέσβου, από γάλα πρόβειο ή μίγμα αυτού με αίγαιο (σε ποσοστό έως 30%) της ίδιας περιοχής.

2.1.2 Προδιαγραφές τυριού Φέτα (Π.Ο.Π)

Στον **Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 853/2004** και στον **Κώδικα Τροφίμων και Ποτών** και συγκεκριμένα στα άρθρα 79 και 80 δίνονται οι υγειονομικοί κανόνες για την παραγωγή και την εμπορία:

«Γάλα» είναι το απαλλαγμένο από πρωτόγαλα προϊόν του ολοσχερούς, χωρίς διακοπή αρμέγματος υγιούς γαλακτοφόρου ζώου, που ζει και τρέφεται υπό υγιεινούς όρους και που δεν βρίσκεται σε κατάσταση υπερκόπωσης. Τα κατώτατα και ανώτατα όρια των φυσικών και χημικών σταθερών των ειδών γάλακτος που αναφέρονται πιο πάνω είναι φαίνονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Κατώτατα και ανώτατα όρια φυσικών και χημικών σταθερών ειδών γάλακτος

Προέλευση	Ειδικό βάρος σε 15° C	Λίπος % (ελάχιστο)	Σ.Υ.Α.Λ. % (ελάχιστο)
Αγελάδας	1,028	3,5	8,50
Κατσίκας	1,032	4,0	9,00
Πρόβατου	1,035	6,0	10,20
Βουβάλου	1,033	6,0	9,70
Ανάμικτο πρόβατου κατσίκας	1,033	5,0	9,60

«Νωπό γάλα» νοείται το γάλα που εκκρίνεται από τους μαστικούς αδένες μιας ή περισσοτέρων αγελάδων, προβατίνων, αιγών ή βουβαλίδων, το οποίο δεν έχει θερμανθεί πέραν των 40°C, ούτε έχει υποβληθεί σε επεξεργασία με ισοδύναμο αποτέλεσμα και διατίθεται στην κατανάλωση χωρίς καμιά άλλη επεξεργασία, εκτός από τη διήθηση και την ψύξη καθώς και την ομοιογενοποίηση.

«Γάλα Κατάψυξης» χαρακτηρίζεται το νωπό γάλα, το οποίο έγινε διατηρήσιμο, με κάποια αναγνωρισμένη μέθοδο ταχείας κατάψυξης, που διατηρείται στη συνέχεια σε θερμοκρασία κατώτερη από -15° C, και το οποίο πρέπει να διατίθεται στην κατανάλωση μετά από πλήρη απόψυξη. Το προϊόν που προσφέρεται έτσι πρέπει να πληροί τους όρους σύστασης και χαρακτήρων γενικά του αντίστοιχου νωπού γάλακτος, από το οποίο προήλθε.

«Γάλα που προορίζεται για την παρασκευή προϊόντων με βάση το γάλα» νοείται είτε το νωπό γάλα που προορίζεται για μεταποίηση, είτε το υγρό ή κατεψυγμένο γάλα, που λαμβάνεται από νωπό γάλα, το οποίο έχει ή δεν έχει υποστεί επιτρεπόμενη φυσική επεξεργασία, όπως θερμική επεξεργασία ή θέρμισμα, και του οποίου έχει ή δεν έχει τροποποιηθεί η σύνθεση, εφόσον οι εν λόγω τροποποιήσεις περιορίζονται στην προσθήκη ή/και την αφαίρεση φυσικών συστατικών του γάλακτος.

«Γαλακτοκομικά προϊόντα»: μεταποιημένα προϊόντα που προέρχονται από την μεταποίηση νωπού γάλακτος ή από την περαιτέρω μεταποίηση τέτοιων μεταποιημένων προϊόντων.

Η Φέτα κατατάσσεται στα μαλακά λευκά τυριά άλμης. Στα τυριά αυτά η υγρασία δεν υπερβαίνει το 58%, ωριμάζουν και διατηρούνται σε άλμη. Σύμφωνα με την **Υπουργική Απόφαση 313025/11-1-94** (ΦΕΚ 8/Β/11-1-94) η ονομασία «ΦΕΤΑ» (FETA) αναγνωρίζεται ως προϊόν ΠΟΠ για το λευκό τυρί άλμης που παράγεται από πρόβειο γάλα ή μίγμα αυτού με γίδινο που προέρχεται αποκλειστικά από τις περιοχές Μακεδονίας, Θράκης, Ηπείρου, Θεσσαλίας, Στερεάς Ελλάδας, Πελοποννήσου και του Νομού Λέσβου.

Το γάλα που πρόκειται να τυροκομηθεί για την παραγωγή Φέτας πρέπει να πληροί τις εξής προϋποθέσεις: το γίδινο γάλα δεν μπορεί να υπερβαίνει το 30% κατά βάρος, η λιποπεριεκτικότητα πρέπει να είναι τουλάχιστον 6% κατά βάρος, το pH πρέπει να είναι τουλάχιστον 6,5, η πήξη του πρέπει να γίνεται εντός 48 ωρών από την άμελξη, πρέπει να προέρχεται από φυλές προβάτων και αιγών παραδοσιακά εκτρεφόμενες και προσαρμοσμένες στην περιοχή παρασκευής της Φέτας και η διατροφή τους πρέπει να βασίζεται στη χλωρίδα της εν λόγω περιοχής, να προέρχεται από αμέλξεις, που γίνονται δέκα ημέρες τουλάχιστον μετά τον τοκετό, να είναι καθαρό, αγνό, υγιεινό, πλήρες και να είναι νωπό ή παστεριωμένο. Απαγορεύεται η παρασκευή «ΦΕΤΑΣ» από άλλο είδος γάλακτος. Στο προς τυροκόμηση γάλα απαγορεύεται η συμπύκνωση, η προσθήκη σκόνης ή συμπυκνώματος γάλακτος, πρωτεϊνών γάλακτος, καζεϊνικών αλάτων καθώς και η προσθήκη χρωστικών και συντηρητικών ουσιών. Προστίθενται παραδοσιακή πυτιά ή άλλα ένζυμα με ανάλογη δράση. Όταν το γάλα παστεριώνεται προστίθενται αβλαβείς οξυγαλακτικές καλλιέργειες βακτηρίων, καθώς και χλωριούχο ασβέστιο, μέχρι 20g/ 100 Kg γάλακτος.

Η τεχνολογία παρασκευής της «ΦΕΤΑΣ» έχει νομοθετηθεί ως εξής: μετά την πήξη του γάλακτος, το τυρόπηγμα τοποθετείται σε ειδικούς υποδοχείς για φυσική στράγγιση, χωρίς πίεση και όταν στερεοποιηθεί το τυρόπηγμα, υποβάλλεται σε ξηρό επιφανειακό αλάτισμα με χονδρόκοκκο αλάτι. Τα τυρόπηγμα στην συνέχεια τοποθετείται σε ξύλινους ή μεταλλικούς υποδοχείς και προστίθεται άλμη περιεκτικότητας σε χλωριούχο νάτριο 7% κατά βάρος. Η ωρίμανση γίνεται σε δυο στάδια: Το πρώτο στάδιο ωρίμανσης πραγματοποιείται σε θαλάμους ωρίμανσης με ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας μέχρι 18⁰ C, σχετικής υγρασίας τουλάχιστον 85% και διαρκεί μέχρι 15 ημέρες. Το δεύτερο στάδιο ωρίμανσης πραγματοποιείται σε ψυκτικές εγκαταστάσεις που εξασφαλίζουν σταθερή θερμοκρασία 2-4⁰ C και σχετική υγρασία 85% τουλάχιστον. Ο συνολικός χρόνος ωρίμανσης κατά τα ανωτέρω δυο στάδια διαρκεί τουλάχιστον δυο μήνες και γίνεται σε εγκαταστάσεις εντός των περιοχών παρασκευής της «ΦΕΤΑΣ». Διατίθεται στο εμπόριο σε ξύλινα ή μεταλλικά δοχεία ή και σε υποσυσκευασία από υλικό κατάλληλο για τρόφιμα.

Τα βασικά χαρακτηριστικά της «ΦΕΤΑΣ» (ποιοτικά, οργανοληπτικά, γευσιογνωστικά, κ.λπ.) είναι: μέγιστη υγρασία 56%, ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 43%. Όσο αφορά την συνεκτικότητα είναι μαλακό τυρί που μπορεί να κόβεται σε φέτες, έχει σχήμα σφηνοειδές ή ορθογωνίου παραλληλεπipedου με διάφορες διαστάσεις και βάρη, χωρίς να σχηματίζει επιδερμίδα. Η μάζα της είναι συμπαγής με λίγες μηχανικές σχισμές, λίγες ή καθόλου οπές ακανόνιστου σχήματος σε όλη τη μάζα της και έχει χρώμα καθαρό λευκό. Έχει γεύση λιπόλυσης, ευχάριστη, ελαφρά όξινη με πλούσιο άρωμα.

Απαγορεύεται η χρήση χρωστικών, συντηρητικών και αντιβιοτικών ουσιών στο τυρί και στην άλμη.

2.2 Γενικοί κανόνες επισήμανσης τροφίμων

Προκειμένου να επιτευχθεί υψηλό επίπεδο προστασίας της υγείας των καταναλωτών και να εξασφαλισθεί το δικαίωμά τους για πληροφόρηση, θα πρέπει να διασφαλισθεί ότι οι καταναλωτές είναι κατάλληλα ενημερωμένοι όσον αφορά τα τρόφιμα που καταναλώνουν λαμβάνοντας υπόψη τις διαφορές αντίληψης των καταναλωτών και των αναγκών τους για πληροφόρηση. Έτσι θα πρέπει να καταρτισθεί κατάλογος όλων των υποχρεωτικών πληροφοριών οι οποίες θα πρέπει καταρχήν να παρέχονται για όλα τα τρόφιμα που προορίζονται για τον τελικό καταναλωτή και τις μονάδες ομαδικής εστίασης.

Η νομοθεσία για την επισήμανση των τροφίμων αναθεωρήθηκε με την έκδοση του **Κανονισμού (Ε.Ε.) αριθ. 1169/2011** που θεσπίζει τις γενικές αρχές την επισήμανση των τροφίμων και κατοχυρώνει το δικαίωμα για πληροφόρηση των καταναλωτών όσο αφορά τα τρόφιμα. Οι λόγοι αναθεώρησης της νομοθεσίας για την επισήμανση των τροφίμων είναι η εξέλιξη των αγορών, νέες απαιτήσεις και προσδοκίες των καταναλωτών, το κατακερματισμένο νομοθετικό πλαίσιο, και η μείωση του διοικητικού φόρτου. Είχε ως σκοπό να αποκτηθεί ένα σύγχρονο, ενιαίο, απλοποιημένο και ευέλικτο πλαίσιο για την προστασία των συμφερόντων του καταναλωτή και την ομαλή λειτουργία της αγοράς.

Με τον όρο **επισήμανση** εννοούμε οποιεσδήποτε μνείες (λεκτικές, εικαστικές), ενδείξεις, εμπορικά σήματα, εμπορικές ονομασίες, εικόνες ή σύμβολα που αναφέρονται σε ένα τρόφιμο και τοποθετούνται σε κάθε συσκευασία, έγγραφο, πινακίδα, ετικέτα, δακτύλιο ή περιλαίμιο που συνοδεύει ή αναφέρεται στο τρόφιμο αυτό.

Πληροφορίες για τα τρόφιμα είναι οι πληροφορίες που αφορούν ένα τρόφιμο και διατίθενται στον τελικό καταναλωτή μέσω επισήμανσης, άλλου συνοδευτικού υλικού ή οποιουδήποτε άλλου μέσου, συμπεριλαμβανομένων των εργαλείων της σύγχρονης τεχνολογίας ή των προφορικών ανακοινώσεων.

Υποχρεωτικές πληροφορίες για τα τρόφιμα είναι οι ενδείξεις οι οποίες απαιτείται να παρέχονται στον τελικό καταναλωτή βάσει της νομοθεσίας. Οι πληροφορίες για τα τρόφιμα δεν πρέπει να είναι παραπλανητικές, ιδίως:

- i. ως προς τα χαρακτηριστικά του τροφίμου και ιδίως τη φύση, την ταυτότητα, τις ιδιότητες, τη σύνθεση, την ποσότητα, τη διατηρησιμότητα, τη χώρα καταγωγής ή τον τόπο προέλευσης, τη μέθοδο παρασκευής ή παραγωγής του
- ii. με την απόδοση στο τρόφιμο αποτελεσμάτων ή ιδιοτήτων που δεν έχει
- iii. με τον υπαινιγμό ότι το τρόφιμο έχει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, ενώ στην πραγματικότητα όλα τα παρόμοια τρόφιμα έχουν αυτά τα χαρακτηριστικά, ιδιαίτερα τονίζοντας την παρουσία ή απουσία ορισμένων συστατικών και/ή θρεπτικών ουσιών
- iv. με το να προτείνουν, μέσω της εμφάνισης, της περιγραφής ή των εικονογραφημένων παραστάσεων, την ύπαρξη συγκεκριμένου τροφίμου ή συστατικού, ενώ στην πραγματικότητα ένα φυσικώς ενεχόμενο συστατικό ή ένα συστατικό που χρησιμοποιείται συνήθως στο εν λόγω τρόφιμο έχει υποκατασταθεί από διαφορετικό συστατικό.

Οι πληροφορίες για τα τρόφιμα πρέπει να είναι ακριβείς, σαφείς και κατανοητές για τον καταναλωτή και δεν πρέπει να αποδίδουν σε οποιοδήποτε τρόφιμο τις ιδιότητες πρόληψης, αγωγής ή θεραπείας οιασδήποτε ανθρώπινης ασθένειας, ούτε να αναφέρονται σε τέτοιες ιδιότητες. Η επιχείρηση στο όνομα της οποίας διατίθεται το τρόφιμο ή ο εισαγωγέας είναι οι υπεύθυνοι για την παρουσία και ακρίβεια των πληροφοριών.

Στην επισήμανση ενός τροφίμου είναι **υποχρεωτική** η αναγραφή των παρακάτω ενδείξεων:

- ✓ ονομασία πώλησης
- ✓ κατάλογος των συστατικών
- ✓ κάθε συστατικό ή τεχνολογικό βοήθημα που προκαλεί αλλεργίες ή δυσανεξίες και χρησιμοποιείται στην παραγωγή ή παρασκευή ενός τροφίμου και εξακολουθεί να υπάρχει στο τελικό προϊόν ακόμη και σε τροποποιημένη μορφή.
- ✓ η ποσότητα ορισμένων συστατικών ή κατηγοριών συστατικών (QUID)
- ✓ η καθαρή ποσότητα του τροφίμου
- ✓ η ημερομηνία ελάχιστης διατηρησιμότητας ή η τελική ημερομηνία ανάλωσης
- ✓ τυχόν ιδιαίτερες συνθήκες αποθήκευσης και/ή συνθήκες χρήσης
- ✓ το όνομα ή η εμπορική επωνυμία και η διεύθυνση του υπευθύνου επιχείρησης τροφίμων
- ✓ η χώρα καταγωγής ή ο τόπος προέλευσης.
- ✓ οδηγίες χρήσης εφόσον η παράλειψή τους θα δυσχέραινε τη σωστή χρήση του τροφίμου
- ✓ η αναγραφή του αποκτηθέντος κατ' όγκο αλκοολικού τίτλου για τα ποτά με περιεκτικότητα σε αιθυλική αλκοόλη μεγαλύτερη από 1,2% κ. ο.
- ✓ η ένδειξη που επιτρέπει την αναγνώριση της παρτίδας
- ✓ διατροφική δήλωση (από 13.12.2016)

Στο ίδιο οπτικό πεδίο πρέπει να αναγράφεται η ονομασία πώλησης και η καθαρή ποσότητα του τροφίμου. Οι υποχρεωτικές πληροφορίες θα πρέπει να είναι εύκολα ορατές, ευανάγνωστες και να μην κρύβονται, καλύπτονται, διαγράφονται ή διακόπτονται από άλλα κείμενα ή εικόνες ή άλλα παρεμβαλλόμενα στοιχεία.

2.2.1 Επισήμανση τυριού «ΦΕΤΑ»

Στις συσκευασίες που περιέχουν τυρί ΦΕΤΑ πρέπει να αναγράφονται υποχρεωτικά οι ακόλουθες ενδείξεις:

- «ΦΕΤΑ» (FETA)
- τυρί
- γάλα πρόβειο ελάχιστο 70% και γίδινο μέγιστο 30%
- από παστεριωμένο γάλα
- ελάχιστα λιπαρά επί ξηρού 43%
- μέγιστη υγρασία 56%
- ημερομηνία παραγωγής
- ημερομηνία ελάχιστης διατηρησιμότητας
- χώρα προέλευσης-παραγωγής του τυριού
- έδρα τυροκομείου παρασκευής τυριού
- το εγκεκριμένο σύμβολο για προϊόν Π.Ο.Π., και το σήμα πιστοποίησης του Agrocert
- σήμα καταλληλότητας - αναγνώρισης
- κάθε συστατικό ή τεχνολογικό βοήθημα που προκαλεί αλλεργίες ή δυσανεξίες και χρησιμοποιείται στην παραγωγή ή παρασκευή ενός τροφίμου και εξακολουθεί να υπάρχει στο τελικό προϊόν ακόμη και σε τροποποιημένη μορφή.
- η καθαρή ποσότητα του τροφίμου
- τυχόν ιδιαίτερες συνθήκες αποθήκευσης και/ή συνθήκες χρήσης
- οδηγίες χρήσης εφόσον η παράλειψή τους θα δυσχέραινε τη σωστή χρήση του τροφίμου
- η ένδειξη που επιτρέπει την αναγνώριση της παρτίδας

- στοιχεία ελέγχου που αναλύονται ως εξής:
 1. τα δύο πρώτα γράμματα της ονομασίας προέλευσης: ΦΕ
 2. ο αύξοντας αριθμός του μέσου συσκευασίας
 3. η ημερομηνία παραγωγής (παραδείγμα ΦΕ-1520-15/07/2014)
 Τα στοιχεία ελέγχου αναγράφονται με ευθύνη του συσκευαστή κατόπιν έγγραφης άδειας της αρμόδιας Διεύθυνσης Γεωργίας, η οποία τηρεί ειδικό βιβλίο παρακολούθησης και ελέγχου ανά παραγωγό φέτας.
- διατροφική δήλωση (από 13.12.2016)

2.3 Ιχνηλασιμότητα – ανιχνευσιμότητα τροφίμων

Ιχνηλασιμότητα - ανιχνευσιμότητα είναι η ικανότητα ιχνηλάτησης και παρακολούθησης τροφίμων, ζωοτροφών και ζώων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τροφίμων ή ουσιών που πρόκειται ή αναμένεται να ενσωματωθούν σε τρόφιμα ή ζωοτροφές, σε όλα τα στάδια της παραγωγής, μεταποίησης και διανομής τους (**Κανονισμός 178/2002**). Η ιχνηλασιμότητα τροφίμων και ζωοτροφών διασφαλίζεται σε όλα τα στάδια παραγωγής, μεταποίησης και διανομής, εκτός από την πρωτογενή παραγωγή για ιδιωτική οικιακή χρήση, οικιακής παρασκευής, χειρισμού ή αποθήκευσης τροφίμων για ιδιωτική οικιακή κατανάλωση. Θα πρέπει να επισημανθεί όμως ότι η ιχνηλασιμότητα από μόνη της δεν εγγυάται την ασφάλεια των τροφίμων αλλά αποτελεί πολύ σημαντικό εργαλείο για τη διαχείριση της επικινδυνότητας που συμβάλλει στην ανάσχεση προβλημάτων σχετικών με την ασφάλεια των τροφίμων.

Στόχοι της ιχνηλασιμότητας σχετιζόμενοι με την ασφάλεια των τροφίμων είναι η γρήγορη και εύκολη διάγνωση ενός προβλήματος, η ταυτοποίηση των ένοχων παρτίδων και ο εντοπισμός τους στη διατροφική αλυσίδα, η στοχοθετημένη και ακριβής εκτέλεση απόσυρσης / ανάκλησης προϊόντων, η στοχοθετημένη και ακριβής ενημέρωση των καταναλωτών για τα προϊόντα που εγκυμονούν κινδύνους, η συλλογή στοιχείων σχετικά με επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην αξιολόγηση επικινδυνότητας από τις επιχειρήσεις τροφίμων και τις αρμόδιες αρχές και τέλος η οριοθέτηση της ευθύνης των εμπλεκόμενων επιχειρήσεων.

Η ιχνηλασιμότητα αποσκοπεί στην πρόληψη των εξής φαινομένων:

- δόλιων πρακτικών ή πρακτικών εξαπάτησης,
- νόθευσης των τροφίμων και
- οποιωνδήποτε άλλων πρακτικών, που ενδέχεται να παραπλανήσουν τον καταναλωτή

Έχει ως στόχο την:

- ασφάλεια των τροφίμων,
- τη δυνατότητα απομάκρυνσης επικίνδυνου τροφίμου, από την αγορά,
- υγιείς κανόνες εμπορίου, τη διαφάνεια και
- την αξιοπιστία της πληροφορίας, που διαχέεται, στον καταναλωτή.

Με τον Κανονισμό (ΕΚ) 178/2002, άρθρο 18, θεσπίζεται για πρώτη φορά ρητά η υποχρέωση των υπευθύνων επιχειρήσεων τροφίμων να διατηρούν συστήματα και διαδικασίες για την ιχνηλασιμότητα. Εισάγεται η απαίτηση ιχνηλασιμότητας ως υποχρέωση σε όλα τα στάδια της παραγωγής, μεταποίησης και διανομής των τροφίμων σε συνδυασμό με το στόχο της ασφάλειας των τροφίμων και της απόσυρσης από την αγορά

μη ασφαλών τροφίμων/ζωοτροφών. Όλες οι επιχειρήσεις από την πρωτογενή παραγωγή, μεταποίηση, βιομηχανική παραγωγή, επεξεργασία, αποθήκευση, μεταφορά, έως τη διανομή και τη διάθεση των τροφίμων υπόκεινται στην απαίτηση της ιχνηλασιμότητας. Η απαίτηση ιχνηλασιμότητας εφαρμόζεται επίσης και στις εμπορικές συναλλαγές μεταξύ λιανοπωλητών. Ωστόσο, οι υπεύθυνοι των επιχειρήσεων τροφίμων δεν οφείλουν να προσδιορίζουν τους άμεσους πελάτες τους, όταν αυτοί είναι οι τελικοί καταναλωτές.

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ε.Ε. οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων και ζωοτροφών οφείλουν να διαθέτουν ένα σύστημα ιχνηλασιμότητας που να βασίζεται στην προσέγγιση «ένα βήμα πίσω»-«ένα βήμα μπροστά» όπως απεικονίζεται και στην Εικόνα 3:

- «ένα βήμα πίσω»: Οι υπεύθυνοι των επιχειρήσεων τροφίμων / ζωοτροφών είναι σε θέση να αναγνωρίζουν κάθε πρόσωπο από το οποίο έχουν προμηθευτεί ένα τρόφιμο, μια ζωοτροφή, ένα ζώο που χρησιμοποιείται για την παραγωγή τροφίμων ή οποιαδήποτε άλλη ουσία που προορίζεται για ενσωμάτωση σε ένα τρόφιμο ή σε μια ζωοτροφή ή αναμένεται ότι θα ενσωματωθεί σε αυτά.
- «ένα βήμα μπροστά»: Οι υπεύθυνοι των επιχειρήσεων τροφίμων / ζωοτροφών καθιερώνουν συστήματα και διαδικασίες για την αναγνώριση των άλλων επιχειρήσεων στις οποίες προμηθεύουν τα προϊόντα τους.



Εικόνα 3. Σύστημα ιχνηλασιμότητας.

Στην υποχρέωση εφαρμογής του άρθ. 18 υπάγονται και τα συστατικά των τροφίμων, τα πρόσθετα και οι αρωματικές ύλες που ενσωματώνονται στα τρόφιμα ενώ δεν υπάγονται τα υλικά συσκευασίας των οποίων η ιχνηλασιμότητα καθορίζεται στον Κανονισμό (ΕΚ) 1935/2004, τα κτηνιατρικά φαρμακευτικά προϊόντα, οι φυτοπροστατευτικές ουσίες και τα λιπάσματα.

Με τον νέο **Εκτελεστικό Κανονισμό (ΕΕ) 931/2011**, που εφαρμόζεται από την 1^η Ιουλίου 2012, τίθενται οι απαιτήσεις ανιχνευσιμότητας στον τομέα των τροφίμων ζωικής προέλευσης που αρχικά όρισε ο Κανονισμός (ΕΚ) 178/2002. Ο νέος Κανονισμός εφαρμόζεται σε μη μεταποιημένα και μεταποιημένα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Κρίνεται σκόπιμο να αναφερθούν οι ορισμοί σχετικά με την μεταποίηση όπως αναφέρονται στον Κανονισμό (ΕΚ) 852/2004. Ως «μεταποίηση»: ορίζεται η ενέργεια με την οποία τροποποιείται ουσιαστικά το αρχικό προϊόν, συμπεριλαμβανομένης της θερμικής επεξεργασίας, του καπνίσματος, του αλατίσματος, της ωρίμανσης, της αποξήρανσης, του

μαριναρίσματος, της εκχύλισης, της εξώθησης ή συνδυασμού αυτών των μεθόδων. Ως «μη μεταποιημένα προϊόντα»: είναι τα τρόφιμα τα οποία δεν έχουν υποστεί μεταποίηση και τα οποία περιλαμβάνουν τα προϊόντα που έχουν υποστεί διαίρεση, χωρισμό, αποκοπή, κοπή, αφαίρεση οστών, πολτοποίηση, αποφλοιώση, εκδορά, κονιοποίηση, τεμαχισμό, καθαρισμό, καλλωπισμό, άλεση, αφαίρεση του κελύφους, ψύξη, κατάψυξη, βαθιά κατάψυξη, ή απόψυξη. Ως «μεταποιημένα προϊόντα»: είναι τα τρόφιμα που προέρχονται από τη μεταποίηση μη μεταποιημένων προϊόντων. Τα προϊόντα αυτά είναι δυνατό να περιέχουν συστατικά τα οποία είναι αναγκαία για την παρασκευή τους ή τα οποία τους προσδίδουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά.

Σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΕ) 931/2011 οι υπεύθυνοι των επιχειρήσεων εξασφαλίζουν ότι οι ακόλουθες πληροφορίες σχετικά με τις αποστολές τροφίμων ζωικής προέλευσης καθίστανται διαθέσιμες στον υπεύθυνο της επιχείρησης στον οποίο παρέχεται το τρόφιμο:

- α) επακριβής περιγραφή του τροφίμου,
- β) ο όγκος ή η ποσότητα του τροφίμου,
- γ) το όνομα και η διεύθυνση του υπευθύνου επιχείρησης τροφίμων από τον οποίο απεστάλη το τρόφιμο,
- δ) το όνομα και η διεύθυνση του αποστολέα (ιδιοκτήτη), αν διαφέρει από τον υπεύθυνο επιχείρησης τροφίμων από τον οποίο απεστάλη το τρόφιμο,
- ε) το όνομα και η διεύθυνση του υπευθύνου επιχείρησης τροφίμων στον οποίο αποστέλλεται το τρόφιμο,
- στ) το όνομα και η διεύθυνση του αποστολέα (ιδιοκτήτη), αν διαφέρει από τον υπεύθυνο επιχείρησης τροφίμων από τον οποίο απεστάλη το τρόφιμο,
- ζ) στοιχεία της παρτίδας, του φορτίου ή της αποστολής, κατά περίπτωση, και
- η) η ημερομηνία αποστολής.

Οι παραπάνω πληροφορίες επικαιροποιούνται καθημερινά και είναι διαθέσιμες τουλάχιστον μέχρι να μπορεί εύλογα να θεωρηθεί ότι το τρόφιμο καταναλώθηκε.

Οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων δεν υποχρεούνται να εφαρμόζουν τη λεγόμενη «εσωτερική ιχνηλασιμότητα» που συνίσταται στη σύνδεση των εισερχομένων με τα εξερχόμενα προϊόντα και την τήρηση αρχείων σχετικά με το χωρισμό και συνδυασμό παρτίδων για την παραγωγή συγκεκριμένων προϊόντων ή για σύσταση νέων παρτίδων εντός της επιχείρησης. Παρ' όλα αυτά ενθαρρύνονται να αναπτύσσουν συστήματα εσωτερικής ιχνηλασιμότητας, σε συνάρτηση με τη φύση και το μέγεθος των δραστηριοτήτων τους. Υποχρεούνται σε απόσυρση από την αγορά τροφίμων που δεν πληρούν τις απαιτήσεις ασφάλειας των τροφίμων. Απόσυρση σύμφωνα με τη νομοθεσία, είναι η απομάκρυνση από την έκθεση και προσφορά μη ασφαλούς τροφίμου η οποία πραγματοποιείται σε οποιοδήποτε στάδιο της τροφικής αλυσίδας και όχι μόνον κατά την παράδοση στον τελικό καταναλωτή. Γενικά ισχύει ότι υψηλό επίπεδο ιχνηλασιμότητας εξασφαλίζει χαμηλό επίπεδο απόσυρσης/ανάκλησης ενώ αντίθετα χαμηλό επίπεδο ιχνηλασιμότητας έχει ως αποτέλεσμα υψηλό επίπεδο απόσυρσης/ανάκλησης.

2.4 Μέθοδοι ταυτοποίησης γαλακτοκομικών προϊόντων

Σήμερα υπάρχει αναγκαιότητα για να βρεθούν γρήγορες, αποτελεσματικές, με μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα, αξιόπιστες μέθοδοι ελέγχου, με τις οποίες θα μπορεί

να προσδιοριστεί η ακριβής σύνθεση του γάλακτος από το οποίο προέρχεται κάποιο τυρί ή γαλακτοκομικό προϊόν γενικότερα. Έχουν αναπτυχθεί πολλές εργαστηριακές τεχνικές για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των λιπών ή των πρωτεϊνών σε μίγματα γάλακτος από διαφορετικά ζωικά είδη για την αντιμετώπιση της νοθείας, με κυμαινόμενο βαθμό επιτυχίας.

Οι μέθοδοι που βασίζονται στον προσδιορισμό της σύνθεσης του λίπους του γάλακτος όπως η αναλογία των διακριτών λιπαρών οξέων ή το προφίλ των τριγλυκεριδίων, παρουσιάζουν το βασικό μειονέκτημα ότι δεν μπορούν να ανιχνεύσουν οποιαδήποτε νοθεία με άπαχο γάλα. Έτσι εφαρμόζονται πλέον εξειδικευμένες τεχνικές όπως η ηλεκτροφόρηση, η χρωματογραφία, οι ανοσολογικές και οι μοριακές τεχνικές.

2.4.1 Ηλεκτροφορητικές τεχνικές

i. Κατακόρυφη ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδιου (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis - PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση εφαρμόζεται εκτενέστατα στη μελέτη των πρωτεϊνών του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων και ιδιαίτερα στο διαχωρισμό των καζεϊνών στα επιμέρους κλάσματά τους. Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί στην ανίχνευση προσθήκης αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο ή αίγιο γάλα και γιαούρτη. Όμως στα τυριά και ιδιαίτερα στα πολύ ώριμα είναι αμφίβολη η αποτελεσματικότητά της καθώς η α_{s1} -καζεΐνη υδρολύεται κατά κανόνα εκτεταμένα κατά τη διάρκεια της ωρίμασης των περισσότερων κατηγοριών τυριών με αποτέλεσμα πολλά προϊόντα αποδόμησης τους να παρουσιάζουν παρόμοια ηλεκτροφορητική κινητικότητα με την αγελαδινή α_{s1} -CN. Η κατακόρυφη ηλεκτροφόρηση μπορεί να εφαρμοσθεί για την ανίχνευση προσθήκης αγελαδινών καζεϊνών στα τυριά μόνο με την ανάλυση των παρα-κ-καζεϊνών, οι οποίες είναι σχετικά σταθερές κατά την ωρίμαση. Ωστόσο οι διαφορές στις αλληλουχίες των αμινοξέων μεταξύ των πρόβειων, αίγιων, και αγελαδινών παρα-κ-καζεϊνών είναι περιορισμένες.

Την μέθοδο αυτή χρησιμοποίησαν οι Ανυφαντάκης et al., (1985) για ανίχνευση προσθήκης αγελαδινού γάλακτος σε τυριά Φέτα χρησιμοποιώντας την αγελαδινή παρα-κ-καζεΐνη, οι Mayer & Hörtner, (1992) για τον προσδιορισμό αγελαδινών καζεϊνών σε γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, οι Kaminarides et al., (1995) για την ανίχνευση προσθήκης αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο τυρί Χαλούμι, οι Kaminarides and Koukiassa, (2002) για την ανίχνευση νοθείας πρόβειου γιαουρτιού με αγελαδινό γάλα, οι Veloso et al., (2002) για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε αίγιο και πρόβειο γάλα και ο Mayer, (2005) για ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε μίγματα γάλακτος και τον προσδιορισμό του ποσοστού του αγελαδινού γάλακτος στα πειραματικά τυριά.

ii. Ισοηλεκτρικός εστιασμός (IEF)

Είναι μια ηλεκτροφορητική τεχνική με την οποία διαχωρίζεται ένα μίγμα πρωτεϊνών υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI). Είναι ιδιαίτερα κατάλληλος για την ανάλυση καζεϊνών που παρουσιάζουν πολλές γενετικές παραλλαγές (Borkova & Snaselova, 2005).

Είναι η επίσημη μέθοδος αναφοράς της Ευρωπαϊκής Κοινότητας. Η Ευρωπαϊκή Ένωση με τον **Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1255/1999** νομοθέτησε την κοινή οργάνωση αγοράς στον τομέα του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων και με τον **Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 273/2008** θεσπίστηκαν λεπτομερείς κανόνες για την εφαρμογή του Κανονισμού 1255/1999 για τις μεθόδους ανάλυσης και ποιοτικής αξιολόγησης του γάλακτος και των

γαλακτοκομικών προϊόντων. Συγκεκριμένα στο άρθρο 6 καθορίζει ότι η αναλυτική μέθοδος αναφοράς για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος και καζεϊνικών αλάτων σε τυριά από γάλα πρόβειο, αίγιο ή βουβάλων και μείγματά τους είναι η ισοηλεκτρική εστίαση που εφαρμόζεται όπως περιγράφεται στο Παράρτημα ΙΧ του Κανονισμού. Βασίζεται στην ανίχνευση των γ-καζεϊνών μετά από πλασμινόλυση και πιο συγκεκριμένα στα διαφορετικά ισοηλεκτρικά σημεία των γ₂- και γ₃-καζεϊνών σε σχέση με αυτά των αντίστοιχων πρόβειων και αίγιων. Τα ισοηλεκτρικά τους σημεία βρίσκονται σε pH μεταξύ 6,5-7,5 (Borkova & Snaselova, 2005). Η μέθοδος είναι κατάλληλη για ανίχνευση νοθείας σε τυρί, αφού δεν επηρεάζεται από τη θερμική επεξεργασία του γάλακτος ή του τυροπήγματος και από την έκταση της πρωτεόλυσης και επιτρέπει την ανίχνευση προσθήκης σε ποσοστό $\geq 0,5\%$. Μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι ο προσδιορισμός νοθείας πρόβειου γάλακτος με γίδινο και αντίστροφα δεν είναι εφικτός (Borkova & Snaselova, 2005). Επιπλέον δεν είναι ακριβής όσον αφορά στον ποσοτικό προσδιορισμό όταν το επίπεδο της νοθείας είναι υψηλό, γιατί υπάρχουν αποκλίσεις καθώς η ένταση των ζωνών αυξάνεται.

iii. Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE)

Χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια στην ανάλυση των πρωτεϊνών του γάλακτος και παρουσιάζει μεγάλες δυνατότητες για την ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων πεπτιδίων. Περιλαμβάνει διάφορες τεχνικές διαχωρισμού.

Την μέθοδο χρησιμοποίησαν οι Cattaneo et al., (1996) και οι Lee et al., (2001) για ανίχνευση προσθήκης αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο και αίγιο γάλα, οι Recio et al., (1997) μελέτησαν τον πολυμορφισμό των πρωτεϊνών του αγελαδινού, πρόβειου και αίγιου γάλακτος και ταυτοποίησαν διαφορετικές γενετικές παραλλαγές στην ολική καζεΐνη του αγελαδινού, πρόβειου και αίγιου γάλακτος, οι Izco et al., (1999) απέδειξαν ότι η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ποσοτικό προσδιορισμό των καζεϊνών του πρόβειου γάλακτος, οι Molina et al., (1999) για το διαχωρισμό και ανάλυση των καζεϊνικών κλασμάτων σε μίγματα αγελαδινού, πρόβειου και αίγιου γάλακτος, οι Molina et al., (2000) για ανάλυση των καζεϊνικών κλασμάτων και των προϊόντων υδρόλυσης τους σε τυριά τύπου Iberico και οι Recio et al., (2004) για την ανίχνευση προσθήκης αίγιου και αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο τυρί Χαλούμι.

2.4.2 Χρωματογραφικές τεχνικές

i. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Εφαρμόζεται εκτεταμένα για το διαχωρισμό των πρωτεϊνικών κλασμάτων πολλών ειδών γάλακτος. Έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της νοθείας ενός είδους γάλακτος με άλλο βάσει του διαφορετικού χρόνου έκλουσης των καζεϊνών.

ii. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανεστραμμένης φάσης (RP-HPLC)

Ο όρος «ανεστραμμένη φάση» αναφέρεται στη χρήση μιας μη πολικής στατικής φάσης και μιας πολικής κινητής φάσης, το αντίστροφο δηλαδή από ότι ισχύει στη χρωματογραφία κανονικής φάσης (Robards et al., 1994). Με τη μέθοδο της RP-HPLC τα συστατικά διαχωρίζονται βάσει του υδρόφοβου χαρακτήρα τους. Έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα από πολλούς ερευνητές για τον διαχωρισμό των κύριων καζεϊνικών κλασμάτων των διαφόρων ειδών γάλακτος, για την ταυτοποίηση των πολυμορφικών του παραλλαγών και για την ανίχνευση νοθείας σε γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα.

Η RP-HPLC έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των καζεϊνικών κλασμάτων του πρόβειου γάλακτος από αυτόχθονες Ελληνικές φυλές (Moatsou et al., 2004c), για τη

μελέτη της σύστασης και του πολυμορφισμού των πρωτεϊνών του αίγιου γάλακτος της φυλής Σκοπέλου (Moatsou et al., 2006) και σε συνδυασμό με ESI-MS για τη μελέτη της αίγιου β-καζεΐνης σε γάλα αυτόχθονων Ελληνικών φυλών. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και για τη συγκριτική μελέτη των πρωτεϊνών του αίγιου γάλακτος, όσον αφορά τα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά τους, από αυτόχθονες Ελληνικές και διεθνείς φυλές (Moatsou et al., 2008).

iii. Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (IEC)

Η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής βασίζεται στις ισχυρές αλληλεπιδράσεις φορτίων μεταξύ των πρωτεϊνών του δείγματος και της στατικής φάσης, που έχουν ως συνέπεια μεγαλύτερους χρόνους ανάλυσης και πλατιές χρωματογραφικές κορυφές. Διακρίνεται σε χρωματογραφία κατιο-ανταλλαγής (CEC) και σε ανιο-ανταλλαγής (AEC).

Οι Kaminarides και Anifantakis, (1993) χρησιμοποίησαν μια ισχυρά ανιο-ανταλλακτική στήλη για το διαχωρισμό των καζεϊνών αγελαδινού, πρόβειου και αίγιου γάλακτος και αναφέρουν ότι η σχηματιζόμενη κορυφή έκλουσης της α_{s1} -καζεΐνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την ανίχνευση προσθήκης αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο και αίγιο γάλα.

Οι Volitaki & Kaminarides, (2001) χρησιμοποίησαν την μέθοδο της ανιο-ανταλλακτικής HPLC για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο τυρί Χαλούμι. Η μέθοδος επιτρέπει την ανίχνευση της προσθήκης αγελαδινού γάλακτος σε ποσοστό $\geq 1\%$ σε πρόβειο τυρί Χαλούμι τόσο κατά την 1η ημέρα όσο και σε τυριά ηλικίας 40 ημερών σε άλμη.

iv. Χρωματογραφία υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων (HIC)

Είναι μια εξειδικευμένη μέθοδος ανεστραμμένης φάσης που επιτρέπει την κατακράτηση πρωτεϊνών σε ήπια υδρόφοβη στατική φάση. Αυτός ο τύπος χρησιμοποιείται συνήθως για το διαχωρισμό πρωτεϊνών. Το κύριο πλεονέκτημα της HIC, σε σχέση με τη συμβατική χρωματογραφία ανεστραμμένης φάσης, είναι ότι λόγω της χρήσης υδατικών διαλυμάτων αποφεύγεται η μετουσίωση των πρωτεϊνών.

Οι Bramanti et al., (2003) χρησιμοποίησαν τη HIC για το διαχωρισμό και τον προσδιορισμό των α_{s1} -, α_{s2} -, β - και κ -καζεϊνών σε νωπό αγελαδινό, πρόβειο και αίγιο γάλα. Η HIC σε συνδυασμό με ισχυρά μέσα μετουσίωσης οδήγησε σε ικανοποιητικό διαχωρισμό και ποσοτικό προσδιορισμό των καζεϊνών σε εμπορικά δείγματα νωπού γάλακτος και τυριών. Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι οι καζεΐνες στα τυριά παρουσίασαν τον ίδιο αριθμό κορυφών όπως και οι μη υδρολυμένες καζεΐνες του γάλακτος. Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση προσθήκης αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο και αίγιο γάλα.

2.4.3 Ανοσολογικές μέθοδοι

Οι ανοσολογικές μέθοδοι είναι κατάλληλες για την ανίχνευση ειδικών κλασμάτων βόειων, πρόβειων ή αίγιων πρωτεϊνών γάλακτος. Βασίζονται στην αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος, χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα. Τα αντισώματα αυτά αντιδρούν με τις πρωτεΐνες ορού ή τα κλάσματα καζεϊνών του γάλακτος (Grappin et al. 2004). Χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση του ζωικού είδους του γάλακτος. Διακρίνονται για την υψηλή εξειδίκευση, τα χαμηλά όρια ανίχνευσης, καθώς και το μικρό κόστος (Haza et al. 1999).

Έχουν περιγραφεί ανοσολογικές τεχνικές όπως η Ακτινωτή Ανοσοδιάχυση (Radial immunodiffusion, RID), η Νεφελομετρία (Nephelometric immunoassay), η

Ανοσοηλεκτροφόρηση (Immunoelectrophoresis) και η Ενζυμική Ανοσοπροσροφητική Μέθοδος προσδιορισμού (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) όπως επίσης έχει αναφερθεί και η τεχνική Surface Plasmon Resonance (SPR) που βασίζεται στη μορφή βιοαισθητήρα.

Από το 1990, η ELISA αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη ανοσολογική μέθοδο για την ανίχνευση νοθείας γάλακτος διαφορετικών ζωικών ειδών. Είναι ένα απλό, ευαίσθητο, γρήγορο, αξιόπιστο και ευέλικτο σύστημα ποσοτικού προσδιορισμού αντιγόνων και αντισωμάτων. Στηρίζεται στην ανάπτυξη και εμφάνιση χρώματος από ένα αντίσωμα ή αντιγόνο που φέρει ένα ένζυμο-δείκτη (συνήθως υπεροξειδάση ή αλκαλική φωσφατάση), το οποίο προκαλεί υδρόλυση ενός χρωμογόνου υποστρώματος. Μπορεί να ανιχνεύσει ποσότητα αντιγόνου 10pg/ml, γεγονός το οποίο εξαρτάται από τη σχέση μεταξύ των διαθέσιμων αντισωμάτων και τη διαμόρφωση της δοκιμασίας (Moatsou & Anifantakis, 2003). Τόσο πολυκλωνικά όσο και τα μονοκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιούνται στις διάφορες μεθόδους ELISA.

2.4.4 Τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR)

Οι βιομοριακές τεχνικές έχουν αποδειχθεί αξιόπιστες, ευαίσθητες και γρήγορες σε περιπτώσεις που θέλουμε να αξιολογήσουμε την αυθεντικότητα προϊόντων όπως τα γαλακτοκομικά. Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) είναι αυτή που έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο, ιδιαίτερα για την ανίχνευση της προέλευσης και την ταυτοποίηση των ειδών στα τρόφιμα (Dalmasso et. al. 2004). Η PCR είναι μια τεχνική ενίσχυσης για τη δημιουργία μεγάλων ποσοτήτων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA in vitro.

Τα δείγματα γάλακτος αποτελούν κατάλληλη πηγή καθαρού DNA λόγω της περιεκτικότητάς τους σε σωματικά κύτταρα, που αποτελούνται κυρίως από λευοκύτταρα και δευτερευόντως από επιθηλιακά κύτταρα. Αυτό το DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για την ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας του χρησιμοποιώντας την τεχνική PCR (Mafra et al. 2008; Moatsou et al. 2009). Το DNA των σωματικών κυττάρων είναι σχετικά σταθερό καθώς δεν επηρεάζεται από τις συνθήκες επεξεργασίας του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων (θερμική επεξεργασία διαφόρων εντάσεων, συμπύκνωση, ξήρανση, ενζυμική ή όξινη πήξη, ζύμωση και ωρίμαση του τυριού). Ο Mayer (2005) αναφέρει ότι ο έλεγχος της νοθείας με τη χρήση της τεχνικής PCR είναι επιτυχής ακόμα και στις περιπτώσεις ώριμων τυριών και θερμικός επεξεργασμένων γαλακτοκομικών προϊόντων για την ανίχνευση αγελαδινών καζεϊνικών αλάτων σε πρόβειο και αίγιο τυρί, χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές (primers). Πρώτο βήμα της εφαρμογής των μοριακών τεχνικών είναι η απομόνωση DNA από τα γαλακτοκομικά δείγματα. Το δεύτερο βήμα είναι η αποτελεσματική ενίσχυση με την τεχνική PCR ενός κατάλληλου στόχου της αλληλουχίας του DNA. Το μιτοχονδριακό DNA (mt) έχει βρεθεί πιο κατάλληλο από το πυρηνικό για την ενίσχυση με την τεχνική PCR. Το τρίτο βήμα των μοριακών τεχνικών είναι η ανίχνευση των προϊόντων ενίσχυσης (amplicons).

Οι τεχνικές PCR σε πραγματικό χρόνο (real time PCR) έχουν εφαρμοστεί επιτυχώς για τον ποσοτικό προσδιορισμό μιας αλληλουχίας στόχου σε γαλακτοκομικό δείγμα. Η ανίχνευση βασίζεται στη συνεχή παρακολούθηση με φθορισμό κατά τη διάρκεια της PCR ενίσχυσης. Η αύξηση του φθορισμού είναι ανάλογη της ποσότητας των ενισχυμένων DNA-στόχων που παράγονται. Η ανίχνευση του είδους του γάλακτος βασίζεται στον

υπολογισμό του βασικού κύκλου (Ct) κατά τον οποίο ανιχνεύεται στατιστικά σημαντικός φθορισμός.

Η συχνότερη εφαρμογή της PCR στην ανάλυση γαλακτοκομικών προϊόντων αφορά στην ανίχνευση νοθείας ενός είδους γάλακτος με άλλο:

Οι Bania et al. (2001) παρουσίασαν μια τεχνική για την ανίχνευση νοθείας αίγειου γάλακτος με αγελαδινό. Η μέθοδος βασίστηκε σε εκκινητές που αναγνωρίζουν το τμήμα 274 bp για το κυτόχρωμα b του αγελαδινού μιτοχονδριακού DNA.

Οι Lopez-Calleja et al. (2004) χρησιμοποίησαν τη μέθοδο για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο και αίγειο γάλα, χρησιμοποιώντας εκκινητές που αναγνωρίζουν το μιτοχονδριακό 12S rRNA γονίδιο. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε νωπά, παστεριωμένα και αποστειρωμένα μίγματα αγελαδινού/πρόβειου και αγελαδινού/αίγειου γάλακτος και επέτρεψε την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε ποσοστό 0,1%.

Οι Lopez-Calleja et al. (2005) εφάρμοσαν την μέθοδο για την ανίχνευση αίγειου γάλακτος σε πρόβειο γάλα χρησιμοποιώντας εκκινητές που αναγνωρίζουν τμήμα 122 bp για το αίγειο μιτοχονδριακό 12S rRNA γονίδιο. Η ανάλυση νωπών και θερμικώς επεξεργασμένων μιγμάτων πρόβειου/αίγειου γάλακτος επέτρεψε την ανίχνευση αίγειου γάλακτος σε ποσοστό 0,1%.

Οι Cheng et al. (2006) χρησιμοποίησαν τη μέθοδο για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος ή σκόνης γάλακτος σε αίγειο γάλα ή σκόνη γάλακτος με όριο ανίχνευσης 0,1% και στις δύο περιπτώσεις, χρησιμοποιώντας εκκινητές που αναγνωρίζουν τμήμα 271 bp του αγελαδινού μιτοχονδριακού DNA.

Οι Kotowicz et al. (2007) εφάρμοσαν μια διπλή PCR για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε αίγειο γάλα χρησιμοποιώντας δύο ζεύγη εκκινητών που αναγνωρίζουν τις αλληλουχίες της περιοχής του μιτοχονδριακού βρόγχου εκτόπισης (D-loop). Η τεχνική αποδείχθηκε εξειδικευμένη και ευαίσθητη και επέτρεψε την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε ποσοστό $\leq 1\%$.

Οι Bottero et al. (2003) εφάρμοσαν την πολλαπλή PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές με στόχο τα μιτοχονδριακά 12S και 16S rRNA γονίδια. Η μέθοδος επέτρεψε την ταυτόχρονη ανίχνευση αγελαδινού, πρόβειου και αίγειου γάλακτος σε γαλακτοκομικά προϊόντα με ευαισθησία 0,5%.

Οι Lopez-Calleja et al. (2007b, 2007a) χρησιμοποίησαν την τεχνική real time PCR για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αγελαδινού και αίγειου γάλακτος σε νωπά και θερμικώς επεξεργασμένα μίγματα αγελαδινού/πρόβειου και αίγειου/πρόβειου γάλακτος αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας δύο ζεύγη εκκινητών με στόχο το μιτοχονδριακό 12S rRNA γονίδιο. Η μέτρηση των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός φθορίζοντος ανιχνευτή (TaqMan), ο οποίος ενισχύει την παρουσία DNA από κάθε ζωικό είδος που υπάρχει στο δείγμα. Η μέθοδος επέτρεψε την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αγελαδινού και αίγειου γάλακτος σε νωπά και θερμικώς επεξεργασμένα μίγματα πρόβειου/αγελαδινού και πρόβειου/αίγειου γάλακτος, σε εύρος 0,5-10% και 0,6-10% αντίστοιχα.

Πολλοί ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει την τεχνική της PCR για την ανίχνευση νοθείας σε τυριά:

Οι Plath et al. (1997) ανέπτυξαν μεθόδους για τη διάκριση των γονιδίων της β-καζεΐνης αγελαδινού, πρόβειου και αίγειου γάλακτος. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η τεχνική PCR-RFLP παρουσίασε μεγαλύτερη ευαισθησία από την PCR-SSCP, επιτρέποντας την ανίχνευση 0,5% αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο και αίγειο τυρί.

Οι Maudet και Taberlet (2001) ανέπτυξαν μια νέα μέθοδο για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε αίγιο τυρί βάσει του μιτοχονδριακού DNA. Η μέθοδος παρουσίασε μεγάλη ευαισθησία, με όριο ανίχνευσης $\leq 0,1\%$ σε αγελαδινό γάλα.

Οι Stefos et al. (2004) περιέγραψαν μια τεχνική PCR-RFLP για την ανίχνευση 1% και 2,5% αγελαδινού γάλακτος σε πρόβιο τυρί Φέτα και γιαούρτι, αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας εκκινητές με στόχο το μιτοχονδριακό κυτόχρωμα b.

Οι Díaz et al. (2007) εφάρμοσαν την τεχνική για την ανίχνευση αίγιου γάλακτος σε πρόβιο τυρί χρησιμοποιώντας εκκινητές που αναγνωρίζουν τμήμα 122 bp με στόχο το μιτοχονδριακό 12S rRNA γονίδιο, με όριο ανίχνευσης 1% αίγιου γάλακτος.

Οι Mafrà et al. (2004) χρησιμοποίησαν την τεχνική της διπλής PCR για την ανίχνευση νωπού, θερμικός επεξεργασμένου και σκόνης αγελαδινού γάλακτος σε πρόβιο τυρί με στόχο τα μιτοχονδριακά 12S και 16S rRNA γονίδια. Η μέθοδος επέτρεψε τόσο την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε ποσοστό 0,1%, όσο και τον ποσοτικό προσδιορισμό σε εύρος 1- 50%. Η ίδια τεχνική χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση αγελαδινού και αίγιου γάλακτος σε αίγιο τυρί με στόχο τα μιτοχονδριακά 12S rRNA γονίδια. Οι ερευνητές αναφέρουν την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε ποσοστό 0,1% και τον ποσοτικό προσδιορισμό σε εύρος 1-60%. Ο ποσοτικός προσδιορισμός και στις δύο περιπτώσεις βασίστηκε σε καμπύλες εξομάλυνσης που προέκυψαν από γραφικές παραστάσεις της σχετικής έντασης του φθορισμού σε συνάρτηση με το ποσοστό του είδους του γάλακτος στα πειραματικά τυριά.

Οι Lanzillo et al., (2005) ανέπτυξαν μία μέθοδο PCR-RFLP στοχεύοντας το γονίδιο του κυτοχρώματος b για ανίχνευση των τεσσάρων κύριων ειδών γάλακτος που χρησιμοποιούνται στα γαλακτοκομικά προϊόντα (αγελαδινό, πρόβιο, αίγιο, βουβαλίσιο). Η συγκριτική ανάλυση των 92 ακολουθιών του κυτοχρώματος b επέτρεψε τον σχεδιασμό εκκινητών για ένα κοινό θραύσμα των τεσσάρων ειδών μεγέθους 275 bp. Τα μοτίβα RFLP που λήφθηκαν με τρία περιοριστικά ένζυμα ήταν διαφορετικά για κάθε είδος.

Τέλος, για την ανίχνευση νοθείας έχουν χρησιμοποιηθεί ανοσοχημικές μέθοδοι σε συνδυασμό με μεθόδους ανάλυσης DNA. Οι Klotz και Einspanier (2001) χρησιμοποίησαν την τεχνική PCR-LCR (Ligase Chain Action) -EIA (Enzyme Immunoassay), που βασίστηκε στην ανίχνευση ενός συγκεκριμένου νουκλεοτιδίου στο DNA του αγελαδινού γάλακτος (*Bos taurus*, γονίδιο β-καζεΐνης, θέση 8411) στο DNA πρόβιου, αίγιου και βουβαλίσιου γάλακτος. Η μέθοδος επέτρεψε την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε ποσοστό 5%.

Περίληπτικά τα αποτελέσματα της τεχνικής PCR για ανίχνευση της γνησιότητας των γαλακτοκομικών προϊόντων παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Συμπερασματικά η ανίχνευση της νοθείας ενός είδους γάλακτος με άλλο που βασίζεται στην ανάλυση των πρωτεϊνών του γάλακτος είναι εξαιρετικά πολύπλοκη αφού η σύστασή τους ποικίλει τόσο μεταξύ των ειδών όσο και μεταξύ του ίδιου είδους. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών του γάλακτος περιπλέκεται ακόμη περισσότερο από την ύπαρξη γενετικού και μη πολυμορφισμού και από την τεχνολογική επεξεργασία του γάλακτος (Borkova & Snaselova 2005). Ο προσδιορισμός πρωτεϊνών με χρωματογραφικές και ηλεκτροφορητικές τεχνικές παρόλο που έχουν σημαντική αξία σε πολλές περιπτώσεις δεν είναι εύκολα εφαρμόσιμες για αναλύσεις δειγμάτων ρουτίνας λόγω του γεγονότος ότι είναι δαπανηρές, χρονοβόρες και περίπλοκες στην εκτέλεσή τους (Asensio et al. 2008). επίσης, είναι μειωμένης διαγνωστικής αξίας όσο αφορά σε ελέγχους ρουτίνας για νοθεία στο γάλα και στο τυρί (Colak et al. 2006), και συχνά είναι ακατάλληλες για σύνθετα προϊόντα λόγω του γεγονότος ότι δεν μπορούν να διαφοροποιήσουν συγγενικά είδη σε επεξεργασμένα προϊόντα.

Πίνακας 6. Περίληπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της PCR για ανίχνευση γνησιότητας γαλακτοκομικών προϊόντων (Mafra et al. (2008))

Τρόφιμο	Είδη	Τεχνική	Γονίδιο στόχος	Όριο ανίχνευσης % (w/w)	Αναφορά
Γάλα και τυριά από ένα ή περισσότερα είδη γάλακτος	Αγελαδινό, πρόβειο, αίγιο, βουβαλίσιο	PCR-RFLP	β-καζεΐνη	0,5	Plath et al., (1997)
	Αγελαδινό, πρόβειο, αίγιο	Multiplex PCR/ PCR-RFLP	12S rRNA / 16S rRNA	0,5	Bottero et al., (2003)
Κρέας, γάλατα και γαλακτοκομικά	Αγελαδινό, πρόβειο, αίγιο, βουβαλίσιο	PCR-RFLP	Κυτόχρωμα b	NR	Lanzilao et al., (2005)
Τυρί Mozzarella	Αγελαδινό, βουβαλίσιο	Duplex PCR	Κυτόχρωμα b	1	Lopez-Calleja et al., (2004)
		Duplex PCR/ PCR-RFLP	Κυτόχρωμα b	1,5	Rea et al., (2001), Di Pinto et al., (2004)
		Species specific PCR	Οξειδάση του κυτοχρώματος I	0,5	Feligini et al., (2005)
		Species specific PCR	12S rRNA	0,1	Lopez-Calleja et al., (2005)
		Real time PCR	Κυτόχρωμα b/ αυξητική ορμόνη	0,1	Lopparelli et al., (2007)
Τυρί από αίγιο και μίγμα γάλακτος	Αγελαδινό	Species specific PCR	D-loop	0,1	Maudet et al., (2001)
	Αγελαδινό, αίγιο	Duplex PCR	12S rRNA	0,1	Mafra et al., (2007)
Τυρί από πρόβειο και μίγμα γάλακτος	Αγελαδινό, πρόβειο	Duplex PCR	12S rRNA / 16S rRNA	0,1	Mafra et al., (2004)
	Αίγιο, πρόβειο	Species specific PCR	12S rRNA	1	Dias et al., (2007)
Νωπό και θερμικά επεξεργασμένο γάλα	Αγελαδινό	Species specific PCR	12S rRNA	0,1	Lopez-Calleja et al., (2004)
	Αίγιο, πρόβειο	Species specific PCR	12S rRNA	0,1	Lopez-Calleja et al., (2005)
	Αίγιο, πρόβειο	Real time PCR	12S rRNA	0,5	Lopez-Calleja et al., (2007)
	Αίγιο, πρόβειο	Real time PCR	12S rRNA	0,5	Lopez-Calleja et al., (2007)
Τυρί Camember και τυρί Φέτα	Αγελαδινό	Species specific PCR	Οξειδάση κυτοχρώματος II/ D-loop/ Κυτόχρωμα b/ 12S rRNA	0,5	Mayer et al., (2005)

NR δεν αναφέρθηκε

Οι μέθοδοι προσδιορισμού με μοριακές και ανοσολογικές τεχνικές είναι πιο ευαίσθητες για την ανίχνευση της αυθεντικότητας των συστατικών των τροφίμων, απαιτούν όμως δαπανηρό εργαστηριακό εξοπλισμό και σημαντικό βαθμό εμπειρίας. Οι μοριακές τεχνικές που βασίζονται στο DNA πέρα από την μεγάλη ευαισθησία παρουσιάζουν και επαναληψιμότητα. Το μόριο του DNA είναι ιδιαίτερα σταθερό και μπορεί να ανιχνευθεί και σε επεξεργασμένα προϊόντα ακόμη και σε αυτά που έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία. Τέλος μπορούν να διακρίνουν στενά συγγενικά είδη.

3. Μοριακοί δείκτες

Οι μοριακοί δείκτες είναι τμήματα DNA, χωρίς άμεση επίδραση στο φαινότυπο, που παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ των προς μελέτη ατόμων, η ανάδειξη των οποίων χρησιμοποιείται για τη μελέτη της κληρονομικότητας χαρακτηριστικών και της ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων των πληθυσμών. Δεν επηρεάζονται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος, είναι ανιχνεύσιμοι σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του οργανισμού, εντοπίζουν ποιοτικές διαφορές και διαφορές τόσο στις αλληλουχίες των γονιδίων όσο και στις περιοχές του γενώματος. Είναι απεριόριστοι σε αριθμό και εμφανίζουν υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού. Το μεγαλύτερο μειονέκτημά τους είναι ότι έχουν υψηλό κόστος και απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό και εξοπλισμό.

Διακρίνονται τρεις κατηγορίες μοριακών δεικτών: τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και οι DNA δείκτες που αφορούν το πυρηνικό και το εξωπυρηνικό DNA.

Οι μοριακοί δείκτες θα πρέπει να συγκεντρώνουν τα περισσότερα από τα εξής γνωρίσματα ώστε να παρουσιάζουν τη μέγιστη χρησιμότητα όπως:

- Παρουσία πολυμορφισμού δηλαδή η ύπαρξη πολλών αλληλόμορφων για κάθε γενετικό τόπο.
- Διασπορά και στην ιδανική περίπτωση ισοκατανομή σε ολόκληρο το γονιδίωμα.
- Απλή κληρονομικότητα που στην καλύτερη περίπτωση ελέγχεται από ένα γενετικό τόπο με συγκυρίαρχα αλληλόμορφα.
- Υψηλό συντελεστή κληρονομικότητας.
- Σταθερός φαινότυπος κάτω από ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς αξιοποιείται ο πολυμορφισμός που παρουσιάζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA και όχι στην παραλλακτικότητα της έκφρασης των γονιδίων.

Η ανάλυση των λιπιδίων είναι κατάλληλη μόνο στις περιπτώσεις που επιζητείται να προσδιοριστούν τα είδη προέλευσης των ζωικών λιπών. Η ανάλυση πρωτεϊνών χρησιμοποιεί μεθόδους που βασίζονται στην ηλεκτροφόρηση, στην χρωματογραφία και σε ενζυμικές ανοσοβιολογικές μεθόδους. Όμως, ο σχετικά μικρός αριθμός τους, το χαμηλό επίπεδο πολυμορφισμού τους, η μετουσίωση των πρωτεϊνών κατά τη θερμική επεξεργασία περιορίζουν σημαντικά το πεδίο χρήσης τους.

Η ικανότητα των μορίων DNA να παραμένουν σταθερά στη θερμική επεξεργασία, η παρουσία τους σε κάθε κύτταρο, η ειδική για κάθε είδος αλληλουχία νουκλεοτιδίων, τα έχουν κατατάξει στην κορυφή των αναλύσεων της ταυτοποίησης ειδών.

Αναλυτικότερα τα πλεονεκτήματα του DNA ως μοριακού δείκτη είναι:

- α) Είναι γενικά πιο πολυμορφικό.
- β) Είναι πιο σταθερό, οπότε πιο εύκολο στη συλλογή και αποθήκευση δειγμάτων αλλά και πιο ανθεκτικό όταν πρόκειται για αναλύσεις επεξεργασμένων κρεάτων.
- γ) Ειδικά, μετά την ανάπτυξη της μεθόδου της PCR και τη δυνατότητα πλέον, της ενίσχυσης και πολλαπλασιασμού μέσω της PCR, ειδικών ακολουθιών-στόχων DNA, με καθορισμένους εκκινητές (primers), μπορεί να γίνει ανάλυση, ακόμα και σε δείγματα που υπάρχει πολύ μικρή ποσότητα DNA προς ανίχνευση. Επιπλέον, η ευαισθησία και η εξειδίκευση της PCR μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά με την ενσωμάτωση και υβριδισμό εσωτερικού ανιχνευτή (probe) (Mohd et al. 2012).

Οι πρώτοι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) (Botstein et al. 1980). Μετά την ανακάλυψη της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αναπτύχθηκαν νέες μέθοδοι μοριακών δεικτών που βασίζονται στον πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA *in vitro*. Το 1990 περιγράφηκε η πρώτη γενιά μοριακών δεικτών με πολυμορφισμό, τα RAPDs (Random

Amplified Polymorphic DNA) (Williams et al. 1990, Welsh & McClelland 1990). Στη συνέχεια, εμφανίστηκαν οι μοριακοί δείκτες δεύτερης γενιάς στους οποίους ανήκουν οι ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats) (Zietkiewicz et al. 1994), AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms) (Vos et al. 1995) και διάφοροι τροποποιημένοι τύποι τους. Ακολούθησαν οι μοριακοί δείκτες τρίτης γενιάς οι οποίοι περιλαμβάνουν τους IFLPs (Intron Fragment Length Polymorphisms) και SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) (Landegren et al. 1998). Σήμερα, χρησιμοποιείται ένας μεγάλος αριθμός μοριακών δεικτών, όπως π.χ. οι SSRs (Simple Sequence Repeat) (Jacob et al. 1991), SCARs (Sequence Characterized Amplified Regions) (Yang & Korban 1996), SPARs (Simple Primer Amplification Reaction) (Gupta et al. 1994), και άλλοι.

4. Μιτοχονδριακό DNA

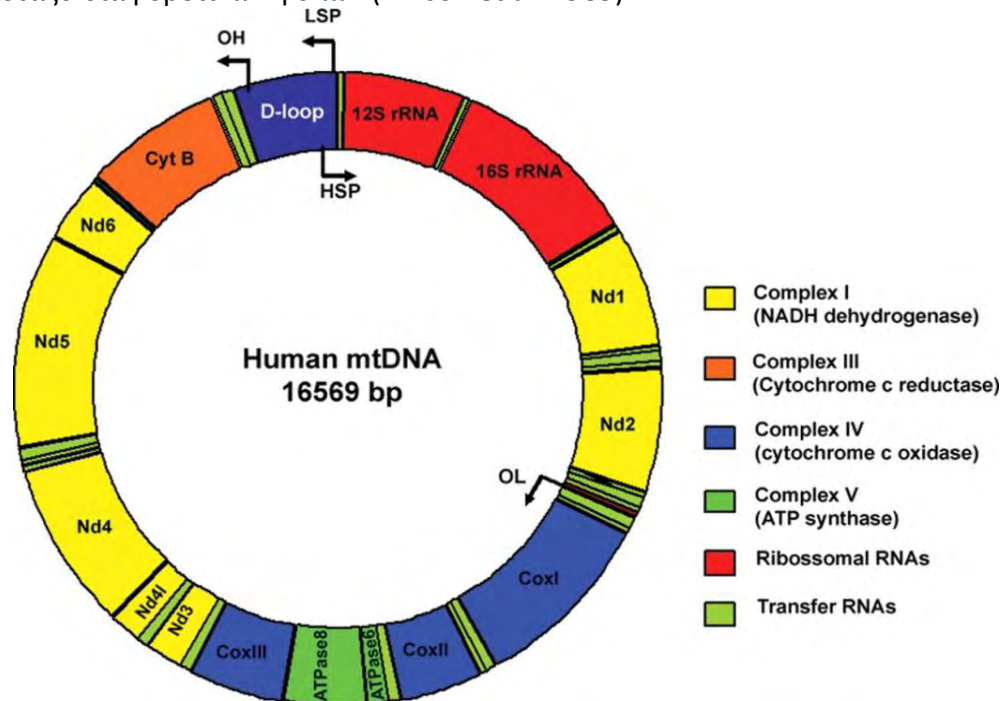
4.1 Γενικά

Τα μιτοχόνδρια είναι ενδοκυτταρικά οργανίδια, με μη σταθερό σχήμα και διαστάσεις 0,3-1 μm σε διάμετρο με 1-10 μm σε μήκος. Το σχήμα και το μέγεθός τους ποικίλει ανάλογα με τον τύπο, τη μεταβολική κατάσταση και τις συγκεκριμένες λειτουργικές ανάγκες των κυττάρων. Τα μιτοχόνδρια είναι ικανά να συντήκονται, να χωρίζονται και να μετακινούνται μέσα στο κύτταρο (Bereiter-Hann & Voth 1994). Έχουν δύο συστήματα μεμβρανών: μία εξωτερική μεμβράνη και μία μεγάλων διαστάσεων εσωτερική μεμβράνη που σχηματίζει πτυχωσεις που ονομάζονται ακρολοφίες (cristae). Έτσι σχηματίζονται δύο διαμερίσματα στο μιτοχόνδριο: ο διαμεμβρανικός χώρος μεταξύ της εξωτερικής και εσωτερικής μεμβράνης και η μήτρα (matrix) που περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη. Τα κύτταρα εξαρτώνται από τα μιτοχόνδρια καθώς αυτά μεταβολίζουν βιολογικά μακρομόρια συνθέτοντας μόρια ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, ενώ τα μιτοχόνδρια εξαρτούνται από το κύτταρο για την ίδια την ύπαρξή τους λόγω του γεγονότος ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα (Moritz et al. 1987). Ο αριθμός των μιτοχονδρίων διαφέρει από κύτταρο σε κύτταρο και είναι μεγαλύτερος στα κύτταρα των μυών (Hartwell et al. 2008). Ένα κύτταρο μπορεί να έχει δεκάδες έως ακόμη και εκατοντάδες μιτοχόνδρια που το καθένα περιέχει δύο έως δέκα αντίγραφα μορίων DNA (Gray 1989; Veltri et al. 1990).

Το μιτοχονδριακό DNA αποτελεί μικρό ποσοστό του συνόλου του DNA του κυττάρου (1-2% στα ζωικά κύτταρα) και αποτελείται από ένα κυκλικό υπερελικωμένο μόριο DNA, μήκους 15.000 έως 17.000 ζευγών βάσεων, χωρίς ιστόνες. Στα σπονδυλωτά οι δύο αλυσίδες του μιτοχονδριακού DNA έχουν περιγραφεί ως ελαφρά L (light) και βαριά H (heavy) η οποία είναι και η κύρια μεταφραζόμενη αλυσίδα (Bibb et al., 1981). Το μήκος του εξαρτάται από το είδος του οργανισμού και είναι κατά πολύ μικρότερο από το nDNA. Η αντιγραφή του γίνεται σε όλη την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Στα μιτοχόνδρια δεν υπάρχουν συστήματα επιδιόρθωσης του DNA. Το μιτοχονδριακό DNA κωδικοποιεί rRNA, tRNA και mRNA για σύνθεση πρωτεϊνών στα μιτοχονδριακά ριβοσωμάτια με έναν ημιαυτόματο μηχανισμό (Attardi et al. 1989). Οι περιοχές κωδικοποίησης του mtDNA περιλαμβάνουν 13 πρωτεϊνικά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που καθορίζουν υπομονάδες ενζύμων που εμπλέκονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, δύο γονίδια rRNA (12S και 16S rRNA) και 22 γονίδια tRNA

(Wolstennholme 1992). Τέλος, υπάρχει μία μη-κωδικοποιημένη περιοχή ελέγχου, των περίπου 1000bp, η οποία ονομάζεται εκτόπισμα βρόγχου (D-Loop) στα σπονδυλωτά και περιέχει την αρχή της αντιγραφής του mtDNA (Anderson et al. 1981, Bibb et al. 1981, Johansen et al. 1990) όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4.

Μελέτες προσδιορισμού της αλληλουχίας του mtDNA έδειξαν ότι απουσιάζουν πλήρως τα ιντρόνια από τα γονίδια, ενώ οι μεσογονιδιακές αλληλουχίες είναι γενικά μικρές ή απούσες (Moritz et al. 1987). Αλλαγές στη διάταξη των γονιδίων εμφανίζονται μόνο μεταξύ διαφορετικών φύλων (Wilson et al. 1985).



Εικόνα 4. Ο χάρτης του μιτοχονδριακού γονιδιώματος του ανθρώπου.

Το mtDNA θεωρείται περισσότερο κατάλληλο σε φυλογενετικές μελέτες από το πυρηνικό DNA για τους εξής λόγους:

- Παρουσιάζει πολλαπλάσιο ρυθμό μεταλλαξιγένεσης σε σχέση με το nDNA, (Moritz et al. 1987) με αποτέλεσμα την ύπαρξη πολυμορφισμών και την δημιουργία ποικιλομορφίας μεταξύ των μιτοχονδρίων τόσο μεταξύ των ειδών όσο και ανάμεσα στο ίδιο είδος. Συγκεκριμένα, στα πρωτεύοντα ο ρυθμός αυτός υπολογίζεται ότι είναι 5-10 φορές υψηλότερος (Brown et al. 1979). Τα κύρια χαρακτηριστικά του υψηλού ρυθμού μεταλλακτικότητας του mtDNA των σπονδυλωτών είναι το εξαιρετικά υψηλό ποσοστό συνώνυμων αντικαταστάσεων, ο υψηλός λόγος μεταπτώσεων/μεταστροφών και η υψηλή συχνότητα μεταπτώσεων C-T στην αλυσίδα L (Gray 1989). Οι περισσότερες μεταλλάξεις που συμβαίνουν αφορούν απλές αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων. Λιγότερο συχνά παρατηρούνται προσθήκες ή ελλείμματα, που συνήθως περιορίζονται στην περιοχή του βρόγχου D σε ασπόνδυλα και κατώτερα σπονδυλωτά (Moritz et al. 1987), και στα ψάρια (Lee et al. 1995).
- Τα μόρια του ζωικού μιτοχονδριακού DNA δεν ανασυνδυάζονται (Clayton 1992; Hayashi et al. 1985), αν και σε ορισμένες μελέτες αναφέρονται ανασυνδυασμοί όπως στο μύδι *Mytilus galloprovincialis* (Ladoukakis & Zouros 2001), στον άνθρωπο

(Awadalla et al. 1999) και στο ψάρι *Platichthys flesus* (Hoarau et al. 2002). Εξαιτίας του γεγονότος ότι τα θηλαστικά έχουν στα μιτοχόνδριά τους όλα τα απαραίτητα ένζυμα για ανασυνδυασμό (Lakshmipathy & Campbell 1999), πιστεύεται ότι ο ανασυνδυασμός είναι πιο συχνός (Rokas et al. 2003).

- Κληρονομείται στα περισσότερα είδη από την μητέρα (Kondo et al. 1990, Gyllestein et al. 1991; Zhao et al. 2004), εκτός από τη δροσόφylla (Kondo et al. 1990), το μύδι (Zouros et al. 1992), το ποντίκι (Gyllensten et al. 1991), το γαύρο (Magoulas & Zouros, 1993), στη μέλισσα (Meusel & Moritz, 1993) και στον άνθρωπο (Schwartz & Vissing, 2002). Έχει αναφερθεί και περίπτωση όπου μόνο τα αρσενικά άτομα κληρονομούν το mtDNA και των δύο γονέων που ονομάζεται διπλή μονογονική κληρονομήση (Zouros et al. 1994, Skibinski et al. 1994).
- Το ζωικό mtDNA εμφανίζει γρήγορα εξελικτικό ρυθμό, έως και δέκα φορές γρηγορότερα από το μη επαναλαμβανόμενο πυρηνικό DNA, ενώ διαφορετικές περιοχές του μιτοχονδριακού DNA εξελίσσονται με διαφορετικούς ρυθμούς παρέχοντας ένα ευρύ φάσμα περιοχών για να επιλεγεί ως στόχος ανάλογα με τον σκοπό της εργασίας (Saccone et al. 1991, Kvist 2000). Ο γρήγορος εξελικτικός ρυθμός αποδίδεται σε μεταλλάξεις που συσσωρεύονται λόγω αδυναμίας επιδιόρθωσης λαθών κατά την αντιγραφή.
- Η ποσότητα του μιτοχονδριακού DNA ανά κύτταρο θεωρείται υπερεπαρκής αφού απαντάται περίπου σε 1000 αντίτυπα (1000 φορές περισσότερο από το πυρηνικό DNA). Αυτό το γεγονός αυξάνει την πιθανότητα επιτυχούς ενίσχυσης με την τεχνική PCR του επιθυμητού τμήματος του γονιδιώματος που μας ενδιαφέρει (Michaels et al. 1982; Robin & Wong 1988).
- Ευκολία απομόνωσης σε σχέση με το πυρηνικό DNA.

Το mtDNA παρόλη την χρησιμότητά του ως δείκτη, παρουσιάζει ταυτόχρονα και ορισμένα μειονεκτήματα:

- Η παρουσία μιτοχονδριακών ψευδογονιδίων στο πυρηνικό γονιδίωμα αρκετών οργανισμών δυσχεραίνει τις πληθυσμιακές μελέτες.
- Το γεγονός ότι το mtDNA αποτελεί ένα μοναδικό απλότυπο θέτει εξ αρχής κάποιους περιορισμούς. Ανεξάρτητα από την ποσότητα της πληροφορίας που έχουμε συλλέξει από αυτή την πηγή, έχουμε ερευνήσει μόνο μία εκδοχή της εξέλιξης. Αυτή η εκδοχή αντανάκλασεν συνήθως τη μητρική ιστορία, με ορισμένες εξαιρέσεις, η οποία μπορεί σαφώς να διαφέρει από τη συνολική ιστορία των πληθυσμών ή του είδους. Συνεπώς, τα συμπεράσματα στα οποία καταλήγουμε μπορεί να είναι βεβιασμένα.
- Το δραστικό μέγεθος πληθυσμού του mtDNA είναι το ένα τέταρτο συγκριτικά με αυτό των πυρηνικών αυτοσωμικών αλληλουχιών. Το γεγονός αυτό μπορεί να έχει τις εξής επιπτώσεις: α) οι εξελικτικές σχέσεις να υπεραπλουστευθούν μέσω των mtDNA δεδομένων, β) η γενετική ποικιλομορφία μπορεί να υποτιμηθεί και γ) να αυξηθεί η αβεβαιότητα στη γενεαλογική ανάλυση εξαιτίας της μη ύπαρξης δεσμών ανάμεσα σε μιτοχονδριακούς απλότυπους (Zhang & Hewitt 2003).

Παρά τα μειονεκτήματα που προαναφέρθηκαν, η ποικιλομορφία mtDNA μεταξύ οργανισμών με μεγάλη συγγένεια που μοιράζονται σε μεγάλο βαθμό παρόμοια nDNA εξηγεί την προτίμηση της χρήσης του mtDNA στην εξελικτική παρακολούθηση ενός

συγκεκριμένου είδους. Επιπλέον η υψηλή γενετική μεταβλητότητα του mtDNA επιτρέπει τον σχεδιασμό εξειδικευμένων εκκινήτων (Kortbaoui et al., 2009).

Το κυκλικό σχήμα του μιτοχονδριακού DNA συμβάλλει στην μεγαλύτερη σταθερότητα στο χρόνο, δεδομένου ότι είναι λιγότερο ευαίσθητο στην αποικοδόμηση σε σύγκρισή με το πυρηνικό DNA (Gefrides et al, 2011). Αυτό οδηγεί σε αυξημένη επιβίωση του mtDNA σε ιδιαίτερα επεξεργασμένα τρόφιμα, που υπόκεινται στις ακραίες συνθήκες της επεξεργασίας τροφίμων.

Από τα παραπάνω εύκολα γίνεται κατανοητό γιατί στην εργασία επιλέχθηκε το mtDNA ως πηγή γονιδίων-μοριακών δεικτών για την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση ειδών γάλακτος στο τυρί ΦΕΤΑ.

4.2 Γονίδια που χρησιμοποιούμε για την ταυτοποίηση των ειδών

Γονίδια του mtDNA που έχουν χρησιμοποιηθεί ως μοριακοί δείκτες για την ταυτοποίηση ειδών, είναι το κυτόχρωμα b, το 12S rRNA, το 16S rRNA, η περιοχή D-loop και τα γονίδια των υπομονάδων της αφυδρογονάσης NADH.

Ο διαφορετικός ρυθμός εξέλιξης που παρατηρείται ανάμεσα στις διαφορετικές περιοχές του mtDNA έχει ως αποτέλεσμα τη χρήση διαφορετικών τμημάτων ως δεικτών στις εκάστοτε φυλογενετικές μελέτες:

- Το 12S rRNA είναι πολύ συντηρημένο και έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως στον προσδιορισμό της φυλογένεσης σε ανώτερα ταξινομικά επίπεδα, όπως τα φύλα και τα υποφύλα (Wan et al. 2004). Το γονίδιο αυτό εμφανίζει σε ικανοποιητικό βαθμό ενδοειδική και διαειδική μεταβλητότητα και αρκετά μεγάλο αριθμό αντιγράφων ανά κύτταρο, αυξάνοντας σημαντικά την ευαισθησία της PCR, ειδικά όταν ένας ιστός υποβάλλεται σε ακραίες συνθήκες επεξεργασίας (Girish et al. 2004).
- Το 16S rRNA χρησιμοποιείται συνήθως για φυλογενετικές μελέτες όσον αφορά σε μεσαία ταξινομικά επίπεδα, π.χ. οικογένειες και σπάνια γένη. Συγκριτικά με το 12S και το 16S rDNAs, τα μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες εξελίσσονται πιο γρήγορα και είναι ισχυρότεροι δείκτες στον προσδιορισμό της εξελικτικής ιστορίας σε κατώτερα επίπεδα, όπως π.χ. οι οικογένειες, τα γένη και τα είδη (Wan et al. 2004).
- Όσον αφορά τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, το γονίδιο για το κυτόχρωμα b (cytb) και για την υπομονάδα I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI) είναι τα πλέον χρησιμοποιούμενα σε φυλογενετικές μελέτες. Εξαιτίας του σχετικά αργού ρυθμού εξέλιξής του, το Cytb έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των φυλογενετικών σχέσεων στα ψάρια και σε άλλα σπονδυλωτά στο ενδοειδικό επίπεδο, αλλά και εντός του γένους και των οικογενειών. Όσον αφορά το γονίδιο για την COI, η χρήση του ως μοριακού δείκτη περιλαμβάνει αρκετά πλεονεκτήματα. Αρχικά, η διαθεσιμότητα universal εκκινήτων για το συγκεκριμένο τμήμα δίνει τη δυνατότητα του πολλαπλασιασμού του στα περισσότερα, αν όχι όλα, τα ζωικά φύλα (Zhang & Hewitt 1997). Στην πραγματικότητα, η εξέλιξη του συγκεκριμένου γονιδίου είναι αρκετά ταχεία ώστε να μπορεί να επιτευχθεί η διάκριση όχι μόνο κοντινών ειδών, αλλά και φυλογενετικών ομάδων εντός ενός είδους (Cox & Hebert 2001; Wares & Cunningham 2001).

- Η μιτοχονδριακή ρυθμιστική περιοχή (Control Region/CR ή Displacement loop/D-loop) είναι η κύρια μη μεταγραφόμενη περιοχή του mtDNA μορίου. Συνήθως, η CR των σπονδυλωτών υποδιαιρείται σε τρία τμήματα, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους τόσο στη νουκλεοτιδική σύσταση όσο και στο ρυθμό εξέλιξής τους. Το κεντρικό τμήμα, που περιέχει το σημείο έναρξης αντιγραφής της βαριάς αλυσίδας, είναι αρκετά συντηρημένο. Αντίθετα, τα δύο πλευρικά τμήματα αυτής της περιοχής (τμήματα I και II) είναι συνήθως υπερμεταβλητά όσον αφορά στις νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις και στον αριθμό των μεταλλάξεων προσθήκης-απαλοιφής. Εξαιτίας του αυξημένου ρυθμού εξέλιξης των τμημάτων I και II, η CR θεωρείται κατάλληλη κυρίως για μελέτες στο επίπεδο του είδους λόγω του υψηλού ποσοστού υποκατάστασης και λόγω ότι είναι η πιο ταχέως εξελισσόμενη περιοχή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (Fajardo et al. 2008).
- Τα γονίδια των υπομονάδων της αφυδρογονάσης NADH (ND2, ND5, ND6) είναι επίσης χρήσιμα για την ταυτοποίηση ενός συγκεκριμένου είδους χρησιμοποιώντας την Real Time PCR.

Στον Πίνακα 7 που ακολουθεί παρουσιάζονται συνοπτικά τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των μιτοχονδριακών γονιδίων-στόχων.

Ταυτοποίηση του είδους του γάλακτος με την μέθοδο PCR βασίζεται στην παρουσία σωματικών κύτταρων στο γάλα των θηλαστικών (Herman 2001). Αρκετές μεθοδολογίες PCR έχουν αναπτυχθεί για αναγνώριση του είδους σε γάλα, τυρί και γιαούρτι με σχεδιασμό εκκινητών για την ενίσχυση ενός αριθμού των μιτοχονδριακών γονιδίων: κυτόχρωμα b (cytb) (Bania et al. 2001; Di Pinto et al. 2004; Herman 2001), τον βρόγχο D-loop (Maudet & Taberlet 2001), 12S rRNA (Lopez- Calleja et al. 2004, 2005), την οξειδάση II του κυτοχρώματος (Mayer 2005), την οξειδάση I του κυτοχρώματος (Feligini et al. 2005), και για πυρηνικά γονίδια (Maudet & Taberlet 2002).

Μεθοδολογία έχει επίσης αναπτυχθεί για διπλή PCR με ειδικούς εκκινητές με στόχο: α) το cytb για αγελαδινό και βουβαλίσιο γάλα (Bottero et al. 2002; Rea et al. 2001), β) τα γονίδια 12S και 16S rRNA για αγελαδινό και πρόβειο γάλα (Mafra et al. 2004), και πολλαπλή PCR που βασίζεται στην ανίχνευση των γονιδίων 12S και 16S rRNA σε βοοειδή, πρόβατα και αιγοπρόβατα (Bottero et al. 2003).

Επίσης, έχει αναπτυχθεί μεθοδολογία που βασίζεται στην PCR-RFLP χρησιμοποιώντας εκκινητές με στόχο το cytb για ανίχνευση προσθήκης αγελαδινού γάλακτος σε τυρί μοτσαρέλλα, για ανίχνευση προσθήκης στο τυρί φέτα αγελαδινού γάλακτος (Branciarri et al. 2000), και προσθήκης άλλου είδους γάλακτος σε πρόβειο γιαούρτη (Stefos et al., 2004).

Ωστόσο, οι περισσότερες από αυτές τις διαδικασίες δεν είναι εφαρμόσιμες για ακριβή ποσοτική μέτρηση.

Πίνακας 7. Συνοπτική παρουσίαση των πλεονεκτημάτων και των μειονεκτημάτων των μιτοχονδριακών γονιδίων-στόχων

Γονίδιο στόχος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Αναφορές
Κυτόχρωμα b	Συνήθως χρησιμοποιείται σε φυλογενετικές μελέτες. Υψηλή μεταβλητότητα μεταξύ των ειδών.	Αδύνατο να διαχωρίσει στενά συγγενικά είδη.	Kvist, 2000 Dooley et al., 2004 Zhang et al., 2007 Santos et al., 2012
12S rRNA	Επαρκής μεταβλητότητα εντός και μεταξύ των ειδών.		Fajardo et al., 2008b Martin et al., 2009 Rojas et al., 2010
Περιοχή D-loop	Υψηλό ποσοστό υποκατάστασης. Η πιο ταχέως εξελισσόμενη περιοχή του mtDNA.		Sawyer et al., 2003 Fajardo et al., 2008a
ND5	Υψηλή μεταβλητότητα μεταξύ των ειδών.	Σε κάποια γένη δεν είναι δυνατό να γίνει διαχωρισμός μεταξύ συγγενικών ειδών.	Farihah Liyana et al., 2009 Kesmen et al., 2009
ND2	Επαρκής μεταξύ και εντός των ειδών μεταβλητότητα.		Kesmen et al., 2009
ATPase6/ATPase8	Επαρκής μεταβλητότητα μεταξύ των ειδών.		
16S rRNA	Περιέχει καλά συντηρημένες περιοχές. Πολύ χαμηλή μεταβλητότητα μεταξύ των ειδών. Συχνά χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη γενικών εκκινητών για είδη θηλαστικών και πτηνών.		Sawyer et al., 2003 Dalmasso et al., 2004 Chiappini et al., 2005 Kesmen et al., 2009

4.3 Η επίδραση της φύσης του γονιδίου-στόχου στην Real-Time PCR με βάση την ταυτοποίηση του DNA

Η επιλογή του γονιδίου που μπορεί να είναι είτε από το mtDNA είτε από το nDNA μπορεί να επηρεάσει την ευαισθησία και την ειδικότητα της ανάλυσης PCR (Lopez-Andreo et al. 2005; Martin et al. 2009). Η ειδικότητα της γονιδιακής αλληλουχίας αποτελεί πλεονέκτημα για την ενίσχυση PCR και παρέχεται από τις υψηλότερες γενετικές παραλλαγές που συμβαίνουν στο mtDNA μεταξύ των ειδών σε σύγκριση με το nDNA, επιτρέποντας τον σχεδιασμό ειδικών εκκινητών PCR για διάφορα είδη (Kortbaoui et al, 2009). Για παράδειγμα, η αλληλουχία του γονιδίου του κυτοχρώματος b είναι εξαιρετικά μεταβλητή μεταξύ των διαφορετικών ειδών (Mohd Hazim et al., 2012; Santos et al., 2012; Zhang et al., 2007), ενώ η μεταβλητότητα εντός του είδους στο 12S rRNA αξιοποιείται για την επίλυση των διαφορών μεταξύ των φυλών ενός συγκεκριμένου είδους (Fajardo et al., 2008b; Rojas et al., 2010).

Ο αριθμός αντιγράφων του γονιδίου του mtDNA συμβάλλει επίσης στην υψηλότερη ευαισθησία των κωδικοποιημένων μιτοχονδριακών γονιδίων ως γενετικών δεικτών (Kortbaoui et al. 2009). Το mtDNA έχει μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με το nDNA στην Real Time PCR. Για τον επιτυχή εντοπισμό του επιλεγμένου γονιδίου του mtDNA έχει αναφερθεί ότι απαιτούνται μόνο δέκα μόρια σε αντίθεση με το nDNA όπου απαιτούνται πολύ περισσότερα αντίγραφα (Andreasson et al. 2002). Επίσης, η παρουσία

πολλών αντιγράφων του mtDNA σε ένα κύτταρο βελτιώνει την ευαισθησία της PCR σε καταστάσεις ακραίας επεξεργασίας (Rojas et al. 2010). Το όριο ανίχνευσης που επιτυγχάνεται με mtDNA κατά την μέθοδο PCR είναι γενικά πολύ χαμηλό, λιγότερο από 5fg όταν το DNA στόχος είναι γονίδιο 12S rRNA (Royas et al. 2010) και 40 fg όταν χρησιμοποιούμε για DNA το κυτόχρωμα b (Lopez-Andreo et al, 2006). Επιπλέον, οι ειδικοί εκκινητές PCR για διάφορα είδη που προέρχονται από μιτοχονδριακά γονίδια μπορούν να ανιχνεύσουν τόσο χαμηλό ποσό όπως 0.1pg του DNA (Kesmen et al. 2009). Οι εκκινητές που έχουν σχεδιαστεί από πυρηνικά γονίδια παρουσιάζουν ευρεία εξειδίκευση και μικρότερη ευαισθησία στη σύνδεση με την αλληλουχία στόχο (Lenstra, 2010). Η χρήση των μιτοχονδριακών γονιδίων για να δημιουργηθούν γενικοί εκκινητές μπορεί να εξαλείψει το πρόβλημα της ευαισθησίας που προκαλείται από τη χρήση των πυρηνικών γονιδίων. Το σύστημα ανίχνευσης που βασίζεται στο mtDNA προσφέρει απόλυτη εξειδίκευση έναντι ενός συγκεκριμένου είδους και περιορίζει διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλα είδη-μη στόχους.

5. Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου εφαρμογής της μεθόδου της Real-Time PCR, για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό του πρόβειου γάλακτος και ανίχνευση παρουσίας αγελαδινού γάλακτος στο τυρί Φέτα.

Ο μοριακός δείκτης που εξετάστηκε ήταν το γονίδιο 12S rRNA του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν PCR και η Real Time PCR. Για τον λόγο αυτό διεξήχθησαν μια σειρά πειραμάτων με στόχο την δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς με χρήση φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green. Όλες οι μέθοδοι ήταν σε θέση να ανιχνεύσουν τα είδη στόχους (πρόβειο ή αγελαδινό) σε συγκεντρώσεις από 1% έως 99% με αίγιο. Οι αναλύσεις δοκιμάστηκαν σε μείγματα με βάση το κρέας αρχικά για να αξιολογηθεί η διαγνωστική ευαισθησία και εξειδίκευση της μεθόδου και στην συνέχεια εφαρμόστηκαν σε δείγματα τυριού Φέτα.

6. Πειραματική πορεία - Μέθοδοι

6.1 Δείγματα

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν δεκατρία δείγματα φέτας και ένα δείγμα κατσικίσιου τυριού που αγοράστηκαν από προθήκες λιανικής πώλησης υπεραγορών. Όλα τα δείγματα ήταν συσκευασμένα και οι επισημάνσεις που έφεραν στην συσκευασία τους ήταν αυτές που αναγράφονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8. Δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία και οι επισημάνσεις που έφεραν

α/α	ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ	ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ						
		ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΑΛΦΑΡΙΘΜΗΤΙΚΟΣ ΚΩΔΙΚΟΣ ΕΓΚΡΙΣΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΟΥ / ΣΥΣΚΕΥΑΣΤΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΕ	ΗΜΕΡΟ-ΜΗΝΙΑ ΠΑΡΑ-ΓΩΓΗΣ	ΗΜΕΡΟ-ΜΗΝΙΑ ΣΥΣΚΕΥ-ΑΣΙΑΣ	ΗΜΕΡΟ-ΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ	LOT
1	ΦΕΤΑ ΧΩΡΙΟ	ΤΥΡΙ ΦΕΤΑ Π.Ο.Π. Αποκλειστικά από φρέσκο παστεριωμένο αιγοπρόβειο γάλα. Υγρασία: μέγιστο 56%, Λιπαρά επί ξηρού: Ελάχιστο 43%.	GR 20.385 EC	ΦΕ 106463	8/3/2014	9/10/2014	9/5/2015	
2	ΦΕΤΑ CARREFOUR	ΤΥΡΙ ΦΕΤΑ Π.Ο.Π. Από ελάχιστο 70% πρόβειο και μέγιστο 30% γίδινο γάλα. Από 100% φρέσκο παστεριωμένο αιγοπρόβειο γάλα, αλάτι τυτιά, καλλιέργεια γιαούρτης,. Μέγιστη υγρασία 56%, Ελάχιστα λιπαρά επί ξηρού: 43%	GR 50.3.20 EC	ΦΕ 5304 / 8-3-2014	5/8/2014	26/11/2014	5/8/2015	
3	ΦΕΤΑ ΜΑΙΝΑΛΟΝ	Μαλακό τυρί από παστεριωμένο αιγοπρόβειο γάλα. Συστατικά: Αιγοπρόβειο γάλα, τυτιά, καλλιέργεια, αλάτι. Μέγιστη υγρασία 56%, Ελάχιστα λιπαρά επί ξηρού: 43%	GR 05.2151 EC	ΦΕ 102646	17/2/2014	14/10/2014	12/4/2015	
4	ΦΕΤΑ ΜΙΚΡΑ ΤΥΡΟΚΟΜΕΙΑ ΤΥΡΟΚΟΜΕΙΟ ΒΙΓΛΑ ΟΛΥΜΠΟΥ	Παραδοσιακό τυρί Φέτα από 100% Ελληνικό παστεριωμένο αιγοπρόβειο γάλα Π.Ο.Π. Μέγιστη υγρασία 56%, Ελάχιστα λιπαρά επί ξηρού: 43%	GR 31.2.1042 EC	ΦΕ 323754 / 8-4-2014	8/4/2014	8/10/2014	7/7/2015	
5	ΦΕΤΑ ΜΕΒΓΑΛ	ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΟ ΤΥΡΙ ΦΕΤΑ Π.Ο.Π. Από φρέσο παστεριωμένο γάλα πρόβειο και κατσικίσιο	GR 18.2.115 EC	368983	10/4/2014	24/6/2014	24/12/2014	
6	ΦΕΤΑ ΗΠΕΙΡΟΣ	ΤΥΡΙ ΦΕΤΑ Π.Ο.Π. Από παστεριωμένο πρόβειο και γίδινο γάλα. Λίπος επί ξηρού ελάχιστο: 43%, Υγρασία μεγ.: 56%	GR 41.2.303 EC	ΦΕ 1089288N	10/6/2014	28/11/2014 10:13:41	28/5/2015	
7	ΦΕΤΑ ΒΑΡΕΛΙΣΙΑ ΛΕΒΕΤΙ	Ελληνικό τυρί από φρέσκο παστεριωμένο αιγοπρόβειο γάλα. Λιπαρά επί ξηρού: min 43% / Υγρασία max: 56%.		ΦΕ 63227	13/5/2014	31/7/2014	3/5/2015	
8	ΦΕΤΑ ΧΩΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ	ΤΥΡΙ ΦΕΤΑ Π.Ο.Π. Από 100% Ελληνικό παστεριωμένο αιγοπρόβειο γάλα βιολογικής γεωργίας. Υγρασία: μέγιστο 56%, Λιπαρά επί ξηρού: Ελάχιστο 43%.	GR 20.385 EC	ΦΕ 104809 19/6/2013	19/6/2013	25/8/2014	25/4/2015	
9	ΦΕΤΑ ΟΛΥΜΠΟΣ	ΤΥΡΙ ΦΕΤΑ Π.Ο.Π. Από παστεριωμένο αιγοπρόβειο γάλα, αλάτι, τυτιά, καλλιέργεια Υγρασία: 56% max, Λιπαρά Ε.Ξ. : 43% min.	GR 46.2.1 EC	ΦΕ 1203317/ 1-7-2014	1/7/2014	13/11/2014	13/5/2015	501311

10	ΦΕΤΑ ΚΑΣΤΟΡΙΑΣ	ΤΥΡΙ ΦΕΤΑ ΚΑΣΤΟΡΙΑΣ Π.Ο.Π. Παράγεται από πρόβειο γάλα 70% και γίδινο γάλα 30%. Μέγιστη υγρασία 56%, Ελάχιστο λίπος επί ξηρού 43%	GR 02.2062 EU / GR 23.23 EU	ΦΕ 1331	18/3/2014	10/10/2014	10/4/2015	
11	ΦΕΤΑ ΔΩΔΩΝΗ	Αυθεντική Ηπειρώτικη Φέτα Π.Ο.Π. Από 100% φρέσκο παστεριωμένο αιγοπρόβειο γάλα. Λιπαρά επί ξηρού: ελάχιστο 43%, Μέγιστη Υγρασία 56%.	GR 20.2.200 EU	ΦΕ 619303	18/4/2014	22/12/2014	18/12/2014	1604
12	ΦΕΤΑ MR. GRAND	ΤΥΡΙ ΦΕΤΑ Π.Ο.Π.	GR 40.90 EU	ΦΕ 103912 / 5-7-14	5/7/2014		16/6/2015	
13	ΦΕΤΑ DELFI	Ελληνικό τυρί φέτα Π.Ο.Π. που παρασκευάζεται από παστεριωμένο αιγοπρόβειο γάλα. Λιπαρά επί ξηρού: min 43%, υγρασία: max 56%	GR 03.2.1037 EU	ΦΕ 47909	23/7/2014	23/10/2014	23/7/2015	
14	ΚΟΛΙΟΣ ΚΑΤΣΙΚΙΣΙΟ ΑΥΘΕΝΤΙΚΟ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΤΥΡΙ	Παστεριωμένο κατσικίσιο γάλα, πρόβειο γάλα (έως 20%), αλάτι, καλλιέργεια, πυτιά. Λίπος επί ξηρού κατ. ελάχιστο 45%, Μέγιστη υγρασία 56%.	GR 26.2.663 EU		12/6/2014		5/5/2015	

6.2 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση ολικού DNA από τα τυριά, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του PureLink Genomic DNA Kit (Invitrogen), που περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Παίρνουμε δείγμα 100 mg τυρί και το τοποθετούμε σε φιαλίδιο erpendorf των 1,5ml.
2. Για την απομάκρυνση του λίπους από τα δείγματα τυριών προσθέτουμε 1000ml διαλύματος SSC 1X, το αναδεύουμε στο vortex και το φυγοκεντρούμε στις 10.000 στροφές/λεπτό για 3 λεπτά. Απομακρύνουμε το λίπος από την επιφάνεια και το υγρό και κρατάμε μόνο το ίζημα.
Παρασκευή διαλύματος 1X SSC: Πρώτα παρασκευάζουμε διάλυμα 20X SSC. Σε φιάλη 1 λίτρου βάζουμε 800ml απιονισμένο νερό και προσθέτουμε 175,3 g NaCl (3M) και 82.2 g κιτρικό νάτριο (300 mM). Στη συνέχεια ρυθμίζουμε το pH του διαλύματος σε 7 με 1M HCl και συμπληρώνουμε μέχρι το 1 λίτρο με απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια αραιώνουμε για να προκύψει διάλυμα 1X SSC (150mM NaCl, 15 mM trisodium citrate).
3. Προσθέτουμε 180 µl Genomic Digestion Buffer και 20 µl πρωτεΐνάση K. Αναδεύουμε σε vortex στις 2.500 στροφές μέχρι να διαλυθεί το ίζημα.
4. Επωάζουμε τα δείγματα στους 55° C για περίπου 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση.
5. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα στις 13.000 στροφές για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο φιαλίδιο erpendorf των 2 ml.
6. Προσθέτουμε 20 µl RNase A και αναδεύουμε στο vortex.
7. Προσθέτουμε 200 µl Genomic Lysis Binding Buffer και αναδεύουμε στο vortex.
8. Προσθέτουμε 200 µl αιθανόλη 100% και αναδεύουμε στο vortex.
9. Μεταφέρουμε το μίγμα σε ειδικά erpendorf με στήλες διαχωρισμού.
10. Φυγοκεντρούμε στις 14.000 στροφές για 1,5 λεπτό.
11. Αλλάζουμε τις στήλες σε καθαρό erpendorf και προσθέτουμε 450 µl Wash Buffer 1 και επαναλαμβάνουμε το βήμα 10.

12. Αδειάζουμε τα σωληνάρια erppendorf από το υγρό και προσθέτουμε 450 μl Wash buffer 2 και φυγοκεντρούμε στις 14.000 στροφές για 3,5 λεπτά.
13. Τοποθετούμε τη στήλη σε καθαρό erppendorf και προσθέτουμε 60 μl Elution Buffer.
14. Τέλος φυγοκεντρούμε, για 1,5 λεπτό στις 14.000 στροφές.
15. Απομακρύνουμε την στήλη και έχουμε έτοιμο το δείγμα του DNA.
16. Αποθηκεύουμε το απομονωμένο DNA στους 4°C για άμεση χρήση και στους -20°C για μελλοντική.

6.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Πρόκειται για μια διαδικασία ποιοτικού προσδιορισμού και διαχωρισμού τμημάτων DNA που μας δίνει την δυνατότητα να πάρουμε πληροφορίες για το μέγεθος των γραμμικών μορίων, την ποιότητα αλλά και την ποσότητα του DNA. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης στηρίζεται στο γεγονός ότι το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο σε ουδέτερο pH. Συνεπώς, μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο τα μόρια DNA έχουν την τάση να κατευθύνονται προς την άνοδο. Παράγοντες που επηρεάζουν την κινητικότητα και το διαχωρισμό τμημάτων του DNA είναι:

- α) το μέγεθος και το σχήμα των προς διαχωρισμό τμημάτων. Τα γραμμικά τμήματα του DNA μετακινούνται μέσα στην αγαρόζη με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του \log_{10} του μοριακού τους βάρους (Helling et al. 1974).
- β) το φορτίο του προς διαχωρισμό τμημάτων. Η ταχύτητα μετακίνησής τους είναι ανάλογη με το φορτίο τους.
- γ) η συγκέντρωση και ο τύπος (κανονική ή χαμηλής τήξης) της αγαρόζης που επιλέγεται για την ηλεκτροφόρηση, εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να αναλυθούν. Πηκτώματα με χαμηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης (0,4-1,2% w/v) χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA, ενώ πηκτώματα με υψηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης (έως 2,5% w/v) είναι καταλληλότερα για την ανάλυση μικρών μορίων DNA όπως φαίνεται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9. Συγκέντρωση αγαρόζης ανάλογα με το μέγεθος του DNA

Αγαρόζη (% w/v)	Μέγεθος DNA (kb)
0,3	5-60
0,5	1-30
0,7	0,8-12
1,0	0,5-10
1,2	0,4-7
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

- δ) η διαμόρφωση του DNA στο χώρο (υπερελικωμένο, γραμμικό, κυκλικό). Η κυκλική μορφή DNA μετακινείται διαφορετικά από το γραμμικό μόριο μέσα στην αγαρόζη.
- ε) η παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου,
- στ) η ισχύς του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται,

ζ) το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιείται (Sambrook et al. 1989).

Η αгарόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που απαντάται στα φύκη. Διαλύεται στο νερό σε υψηλές θερμοκρασίες και σχηματίζει καθώς ψύχεται πήκτωμα. Η αгарόζη που χρησιμοποιείται είναι υψηλής καθαρότητας γιατί οι προσμίξεις επηρεάζουν την διαχωριστική ικανότητα. Στο πήκτωμα προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο, μια χρωστική που παρεμβάλλεται ανάμεσα στα επίπεδα που ορίζουν οι αζωτούχες βάσεις νουκλεοτιδίων σε διαδοχικές θέσεις και μας δίνει την δυνατότητα να παρατηρήσουμε τις ζώνες του DNA στο πήκτωμα σε φωτισμό υπεριώδους ακτινοβολίας. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μεταλλαξιογόνο και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά τον χειρισμό του.

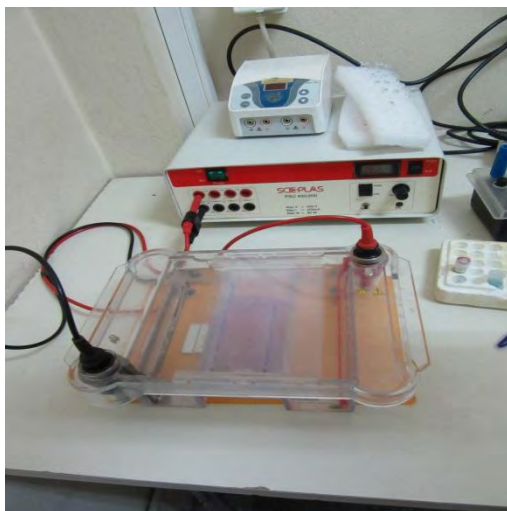
Στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα προστίθεται διάλυμα φόρτωσης (loading buffer), το οποίο εξυπηρετεί τρεις σκοπούς:

- α) αυξάνει την πυκνότητα των δειγμάτων ούτως ώστε τα δείγματα να φορτωθούν στις κατάλληλες θέσεις του πηκτώματος και να μη διαχυθούν στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Περιέχουν συνήθως γλυκερόλη, σουκρόζη και φυκόλη για να καταβυθίζεται το DNA και οι χρωστικές.
- β) προσθέτει χρώμα στα δείγματα, διευκολύνοντας την τοποθέτησή τους στο πήκτωμα και
- γ) περιέχει χρωστική, που σε παρουσία ηλεκτρικού πεδίου, κινείται προς την άνοδο με προβλέψιμο ρυθμό (Sambrook et al. 1989). Οι χρωστικές που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι το κυανό του ξυλενίου και το μπλε της βρωμοφαινόλης. Τα κυριότερα διαλύματα φόρτωσης που χρησιμοποιούνται στις ηλεκτροφορήσεις αгарόζης είναι το TAE (Tris acetate EDTA) και το TBE (Tris borate EDTA). Το TAE προσφέρει μεγαλύτερη ανάλυση για μεγάλα τμήματα DNA. Αυτό σημαίνει χαμηλότερη τάση, περισσότερος χρόνος αλλά καλύτερο προϊόν. Η παρουσία DNA σε ικανοποιητική συγκέντρωση, χωρίς προσμίξεις RNA και πρωτεϊνών, δηλώνεται με την παρουσία μιας μόνο ευκρινούς ζώνης, με το πέρας της ηλεκτροφόρησης.

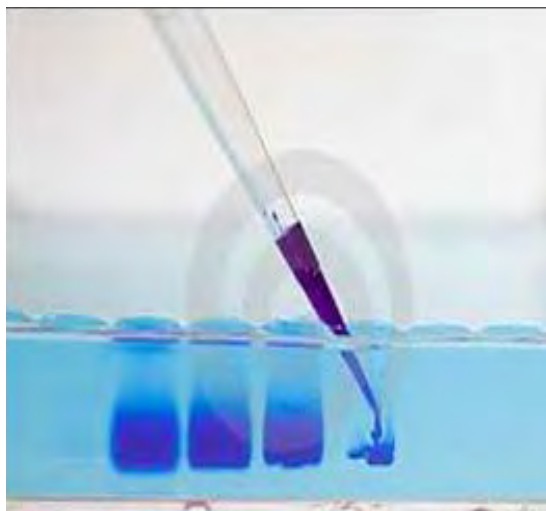
Το μέγεθος των τμημάτων καθορίζεται ύστερα από σύγκρισή τους με διάλυμα που περιέχει τμήματα DNA γνωστών μεγεθών. Το διάλυμα αυτό, δίνει την δυνατότητα προσδιορισμού τόσο της σχετικής συγκέντρωσης όσο και του μοριακού βάρους του DNA και ονομάζεται κλίμακα DNA (DNA ladder ή molecular weight marker), ακολουθεί την ίδια πορεία ηλεκτροφόρησης, με τα προϊόντα της PCR, για τη δυνατότητα σύγκρισής τους.

Στην παρούσα εργασία, η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης χρησιμοποιήθηκε σε δύο φάσεις: Αρχικά μετά την απομόνωση του μιτοχονδιακού DNA, για να βεβαιωθεί ότι υπάρχει σε ικανοποιητική συγκέντρωση, χωρίς προσμίξεις, με την παρουσία μιας ευκρινούς ζώνης. Έπειτα μετά την ολοκλήρωση της PCR, η ύπαρξη μιας ευκρινούς ζώνης στο πήκτωμα δηλώνει την απουσία παραπροϊόντων.

Ο εξοπλισμός που απαιτείται για την ηλεκτροφόρηση είναι: θάλαμος ηλεκτροφόρησης και τροφοδοτικό συσκευής, ο δίσκος πηκτώματος, το χτένι δειγμάτων, το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης, ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης, βρωμιούχο αιθίδιο και τράπεζα λάμπας υπεριώδους. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε απεικονίζεται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση.



Εικόνα 6. Φόρτωση δειγμάτων στο πήκτωμα αναρόζης.

Για την τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

TAE 50x (500ml)

Tris Base 2M

Acetic Acid 7,7%

EDTA 0,05M

ddH₂O έως τα 500ml

Loading buffer 6x (10ml)

Bromophenol blue 0.1% w/v

TBE 1X Glycerol 8,7%

ddH₂O έως τα 10ml

Αρχικά, παρασκευάζουμε διάλυμα TAE 1x αραιώνοντας το πυκνό διάλυμα 50x (20ml σε τελικό όγκο 1lt).

Για την προετοιμασία της πηκτής αναρόζης ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Προετοιμασία του εκμαγείου στο οποίο θα στερεοποιηθεί η πηκτή.
2. Προετοιμασία της πηκτής. Χρησιμοποιήθηκαν 1,0 g αναρόζης και 50 ml TAE 1x για την παρασκευή διαλύματος 2%.
3. Θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων. Κατά τη θέρμανση πρέπει να γίνεται συχνή ανάδευση του διαλύματος.
4. Το διάλυμα ανακινείται έως ότου κρυώσει.
5. Προστίθενται 5 μl βρωμιούχου αιθιδίου (10mg/ml).
6. Τοποθέτηση του διαλύματος στο εκμαγείο.
7. Εισάγεται το ειδικό χτενάκι στην πηκτή για να σχηματιστούν οι θέσεις “πηγάδια” στις οποίες θα εισαχθεί το DNA.
8. Όταν η πηκτή στερεοποιηθεί αφαιρείται το χτενάκι και η χαρτοταινία.
9. Τοποθέτηση της πηκτής μαζί με τη μήτρα σε μία συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει TAE 1X μέχρι να καλυφτεί το πήκτωμα.
10. Τα δείγματα του DNA αναμειγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης. Στην περίπτωση του ελέγχου της απομόνωσης αναμειγνύουμε 3 μl loading buffer με 2 μl DNA, στην περίπτωση ελέγχου της αντίδρασης της PCR αναμειγνύουμε 3 μl loading

buffer με 5μl DNA (PCR προϊόν) και στη συνέχεια εισαγωγή των δειγμάτων στις θέσεις της πηκτής.

11. Φόρτωση των δειγμάτων στα πηγάδια (Εικόνα 6).
12. Κλείνουμε την συσκευή, τη συνδέουμε με το ρεύμα και ρυθμίζουμε την τάση στα 100V. Η ύπαρξη φυσαλίδων είναι ενδεικτικές της ροής του ρεύματος και το DNA μετακινείται προς το θετικό ηλεκτρόδιο. Μετά από περίπου 30 λεπτά είναι δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στην πηκτή. Το DNA καθίσταται ορατό με την προσθήκη στο δείγμα και στο πήκτωμα βρωμιούχου αιθιδίου το οποίο ενσωματώνεται και μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία φθορίζει. Το όριο ανίχνευσης είναι περίπου 20 ng DNA. Για την οπτικοποίηση των τμημάτων του DNA στο πήκτωμα, το τελευταίο τοποθετείται σε τράπεζα λάμπας υπεριώδους στο 320 nm ή σε ειδική συσκευή απεικόνισης.

6.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - PCR (Polymerase Chain Reaction)

Η PCR είναι μία μέθοδος που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA ή cDNA οποιασδήποτε προέλευσης (πυρηνικό ή μιτοχονδριακό) *in vitro* σε εκατομμύρια αντίγραφα σε σύντομο χρόνο. Η τεχνική περιγράφηκε και εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1985 και σήμερα θεωρείται μια από τις σημαντικότερες επιστημονικές ανακαλύψεις της δεκαετίας και έχει αλλάξει, με επαναστατικό τρόπο, τη μελέτη του DNA. Ο εφευρέτης της μεθόδου είναι ο Kary Mullis και τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1993. Πρόκειται δηλαδή για μία ενζυμική μέθοδο σύνθεσης γονιδιακού DNA. Η τεχνική έχει αποδειχτεί εξαιρετικά χρήσιμη σε πολλές εφαρμογές όπως: ποσοτική μέτρηση RNA ή DNA, κλινική μικροβιολογία, γενετική διαγνωστική, κλινική διαγνωστική, ανάλυση πληθυσμών, αρχαιολογία, ιατροδικαστική, κλωνοποίηση, χαρακτηρισμός αγνώστων μεταλλάξεων, πολλαπλασιασμός αγνώστων αλληλουχιών, ανάλυση γενώματος, τεστ πατρότητας.

Τα πλεονεκτήματα που εμφανίζει η μέθοδος είναι:

- α) ταχύτητα και ευκολία στην χρήση: η ενίσχυση του DNA μέσω της PCR μπορεί να πραγματοποιηθεί σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα ορισμένων ωρών. Επιπροσθέτως, τα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι ασφαλή (χωρίς ραδιενεργά ισότοπα) και ο εξοπλισμός σχετικά απλός.
- β) ευαισθησία: Με την PCR μπορεί κανείς να πολλαπλασιάσει αλληλουχίες από τμήματα DNA τα οποία έχουν υποστεί εκτεταμένη αποικοδόμηση, ακόμα και από ιστούς οι οποίοι διατηρούνται σε παραφίνη ή φορμαλδεΰδη. Επίσης, δίνεται η δυνατότητα πολλαπλασιασμού αλληλουχιών έχοντας ως βάση πολύ μικρές ποσότητες DNA στόχου, ακόμα και DNA προερχόμενο από ένα κύτταρο. Εντούτοις, η ευαισθησία της μεθόδου απαιτεί μεγάλη προσοχή για την αποφυγή μολύνσεων από εξωγενές γενετικό υλικό.

Εμπόδια στη χρήση της μπορεί να παρουσιάσουν οι απαιτούμενες αποστειρωμένες συνθήκες, η σχεδίαση και σύνθεση των κατάλληλων εκκινητών, καθώς και η δημιουργία του κατάλληλου προγράμματος για την εκάστοτε αντίδραση. Ένα ακόμη μειονέκτημα αφορά την ποσότητα του προϊόντος της PCR που λαμβάνεται σε μία αντίδραση, η οποία συγκριτικά με την ποσότητα που μπορεί να πάρει κανείς με τη βοήθεια της κλωνοποίησης βάσει κυττάρων, είναι πολύ περιορισμένη. Αυτό μπορεί να

οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως είναι η ποιότητα του DNA στόχου, η ενεργότητα της πολυμεράσης, καθώς και ο ανταγωνισμός μεταξύ των εκκινητών και των συμπληρωματικών αλυσίδων για υβριδισμό με την αλληλουχία στόχο. Επιπλέον, το μέγεθος των αλληλουχιών που μπορούν να κλωνοποιηθούν με τη βοήθεια της PCR κυμαίνεται από 0,1-5 Kb, σε αντίθεση με άλλες μεθόδους με τις οποίες μπορούν να κλωνοποιηθούν τμήματα μεγέθους έως και 2 Mb. Τέλος, ένα από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα είναι η αδυναμία επιδιόρθωσης των σφαλμάτων κατά την αντιγραφή από την Taq πολυμεράση, επειδή το ένζυμο δεν έχει δράση 3'-5' εξωνουκλεάσης.

Σύμφωνα με τους Mullis et al., 1987 σε ένα τυπικό διάλυμα PCR είναι απαραίτητα τα εξής:

- **Μήτρα DNA (template DNA).** Είναι μια μικρή ποσότητα DNA η οποία περιλαμβάνει την αλληλουχία που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Το μέγεθος του DNA δεν αποτελεί κρίσιμο παράγοντα. Δεν πρέπει όμως να είναι αποδομημένο στην περιοχή του στόχου, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα να πολλαπλασιαστεί αυτή η περιοχή και ταυτόχρονα να είναι υψηλής καθαρότητας, απουσία φαινολών, πολυσακχαριτών, EDTA ή άλλων χημικών που μπορούν να έχουν ανασταλτική επίδραση στην αντίδραση.
- **Εκκινητές (primers).** Οι εκκινητές είναι μικρές συνθετικές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες που σχεδιάζονται βάση της αλληλουχίας που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικοί εκκινητές (ζεύγος). Κάθε ένας εκκινητής έχει αλληλουχία βάσεων συμπληρωματική προς εκείνη που βρίσκεται στο 3'-OH άκρο των δύο αντί-παράλληλων αλυσίδων του DNA-προτύπου. Καθορίζουν τα άκρα του τμήματος που θα αντιγραφεί και αντιπροσωπεύουν τις περιοχές από τις οποίες θα ξεκινήσει η διαδικασία σύνθεσης αντιγράφων DNA. Η παρουσία τους είναι απαραίτητη, γιατί το ένζυμο DNA πολυμεράση δεν είναι ικανό να συνθέσει εκ νέου καινούργια αλυσίδα DNA. Οι σημαντικότεροι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών είναι:
 1. Μοναδικότητα: για κάθε ζεύγος εκκινητών πρέπει να υπάρχει αποκλειστικά ένας στόχος στη μήτρα του DNA. Επίσης δεν πρέπει να υπάρχει στόχος για τους εκκινητές πάνω σε μόρια DNA από πιθανή επιμόλυνση.
 2. Μήκος: το μήκος των εκκινητών επιδρά τόσο στην μοναδικότητά τους όσο και στη θερμοκρασία τήξης/υβριδοποίησής τους. Οι εκκινητές έχουν μήκος συνήθως 17-30 βάσεις και ελεύθερο 3'-OH άκρο. Όσο αυξάνεται το μήκος τους τόσο αυξάνεται και η ειδικότητα πρόσδεσης μόνο με το στόχο, ενώ επίσης αυξάνονται οι θερμοκρασίες τήξης/υβριδοποίησης.
 3. Σταθερότητα: Η επιμήκυνση από την Taq πολυμεράση ξεκινά όταν η αλληλουχία στο 3' άκρο του εκκινητή υβριδοποιηθεί σταθερά στη μήτρα DNA. Αν στο 3' άκρο του εκκινητή εντοπίζονται τρεις ή παραπάνω βάσεις C/G μπορεί να προσδεθεί σταθερά σχεδόν σε όλες τις περιοχές της μήτρας με τρεις συμπληρωματικές βάσεις G/C. Για την αποφυγή υβριδοποίησης σε πολλαπλά ή σε λανθασμένα σημεία λόγω πρόσδεσης του 3' άκρου του εκκινητή, συνήθως στο σχεδιασμό προτιμώνται πολύ σταθερά 5' άκρα και λιγότερα σταθερά 3' άκρα. Προτιμώνται 5' άκρα με μία ή δυο βάσεις G/C, και 3' άκρα με μία ή και καμία βάση G/C.
 4. Σύσταση βάσεων: Επηρεάζει την υβριδοποίηση, τη θερμοκρασία τήξης/πρόσδεσης και τη σταθερότητα. Προτιμώνται οι αλληλουχίες τυχαίας

σύστασης. Αποφεύγονται οι περιοχές πλούσιες σε A-T είτε σε G-C. Προτιμάται μέση περιεκτικότητα σε G-C, περίπου 40-60% γιατί οι πλούσιοι σε G-C είναι πιο ανθεκτικοί σε υψηλές θερμοκρασίες υβριδισμού, ωστόσο είναι πιο επιρρεπείς σε αυτό-υβριδισμό.

5. Θερμοκρασία Αποδιάταξης (melting temperature, T_m): Είναι η θερμοκρασία κατά την οποία το 50% των μορίων του DNA είναι δίκλωνα μόρια. Εξαρτάται κυρίως από τη σύσταση της αλληλουχίας του DNA. Υψηλότερη περιεκτικότητα σε G-C έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό περισσότερων δεσμών υδρογόνου άρα υψηλότερο T_m. Η θερμοκρασία των 55° C είναι καλή για έναν τυπικό ολιγονουλεοτιδικό εκκινητή 20 βάσεων με περίπου 50% σύσταση σε G-C. Μεγαλύτερες θερμοκρασίες μπορεί να είναι απαραίτητες για αύξηση της ειδικότητας του εκκινητή.
6. Θερμοκρασία υβριδοποίησης T_a: είναι η θερμοκρασία κατά την οποία οι εκκινητές προσδένονται στη μήτρα του DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού των δύο εκκινητών πρέπει να είναι παραπλήσια.
7. Εσωτερικές δομές: η απόδοση της αντίδρασης PCR μειώνεται δραματικά στις περιπτώσεις που οι εκκινητές υβριδοποιούνται μεταξύ τους και σχηματίζουν δομές φουρκέτας ή ομοδιμερίζονται.
8. Συμπληρωματικότητα: Ο εμπρόσθιος (forward) και ο ανάστροφος (reverse) εκκινητής πρέπει να είναι κατάλληλα σχεδιασμένοι ώστε να λειτουργούν στις ίδιες συνθήκες. Τα ζεύγη των εκκινητών πρέπει να έχουν παρόμοιες θερμοκρασίες αποδιάταξης και οι T_m των δυο εκκινητών δεν πρέπει να διαφέρουν παραπάνω από 3-5° C. Εκκινητής με T_m υψηλότερη από τη θερμοκρασία υβριδοποίησης της αντίδρασης μπορεί να προσδεθεί μη ειδικά και να ενισχύσει λάθος περιοχή της αλληλουχίας του DNA. Εκκινητής με T_m χαμηλότερη από τη θερμοκρασία υβριδοποίησης της αντίδρασης μπορεί να μην προσδεθεί καθόλου και να μην αποδώσει προϊόν PCR.

Ο σχεδιασμός και η επιλογή της αλληλουχίας των εκκινητών είναι αρκετά πολύπλοκος και ως εκ τούτου πραγματοποιείται σχεδόν πάντα μέσω υπολογιστικών προγραμμάτων. Όλες οι παραπάνω παράμετροι είναι καθορισμένες και κωδικοποιημένες τόσο σε εντολές προγραμμάτων on line όσο και σε λογισμικά υπολογιστών.

- **DNA πολυμεράση.** Το ένζυμο DNA πολυμεράση δρα ως καταλύτης κατά τη διαδικασία αντιγραφής του DNA *in vivo* και *in vitro*. Για να δράσει, απαιτεί την παρουσία μονόκλωνου DNA-προτύπου, καθώς και την παρουσία 5'-τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων. Καταλύει την προσθήκη μονονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο των αφετηριών στην κατεύθυνση 5'→3' (Berg et al. 2002) και κατ' αυτόν τον τρόπο οι εκκινητές επιμηκύνονται. Έτσι συνθέτονται δύο νέες αλυσίδες DNA, συμπληρωματικές προς τις πρότυπες. Τα τελευταία χρόνια, ως ένζυμο χρησιμοποιείται η θερμοανθεκτική Taq- DNA πολυμεράση, που πήρε το όνομά της από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq) από το οποίο απομονώθηκε από τους Chien et al. (1976). Το ένζυμο αντέχει τις υψηλές θερμοκρασίες που αναπτύσσονται σε μια αντίδραση PCR οι οποίες μπορούν να αποδιατάξουν μια πρωτεΐνη. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την δράση του ενζύμου είναι μεταξύ 72° C και 75° C. Ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι 9 λεπτά στους 97,5° C και μπορεί να αντιγράψει ένα κλώνο 1000 βάσεων σε λιγότερο από 10 δευτερόλεπτα στους 72° C, ενώ η συχνότητα σφάλματος είναι χαμηλή και έχει

υπολογιστεί στο 0,25% μετά από 30 κύκλους της PCR (Saiki et al. 1988). Έχει δράση 5'→3' πολυμεράσης, και 5'→3' εξωνουκλεάσης ενώ στερείται 3'→5' εξωνουκλεάσης. Η Taq προστίθεται μία φορά στην αρχή της αντίδρασης και παραμένει ενεργή σε όλη την διάρκειά της. Η συνιστώμενη συγκέντρωση του ενζύμου είναι 1-2,5 units για 100 μl όγκου αντίδρασης όταν είναι κατάλληλες και οι υπόλοιπες παράμετροι (Lawyer et al. 1993).

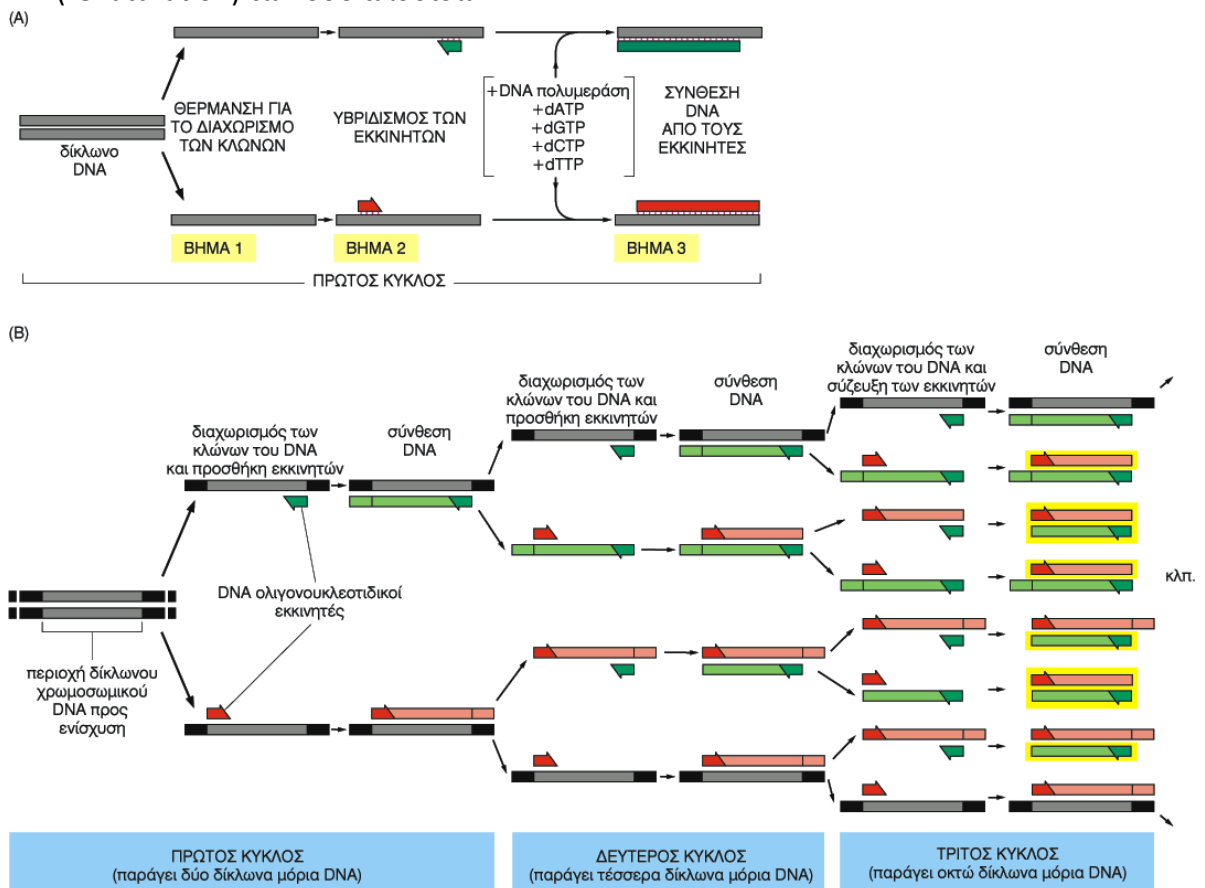
Σήμερα έχουν αναπτυχθεί διάφορα παράγωγα της Taq πολυμεράσης με βελτιωμένα χαρακτηριστικά και μεγαλύτερη εξειδίκευση. Αυτές οι πολυμεράσες δεν επιτρέπουν την λάθος τοποθέτηση βάσεων κατά την σύνθεση του DNA, εξαιτίας της 3'-5' επιδιορθωτικής ικανότητας (proofreading activity) που έχουν. Η Taq πολυμεράση δεν παρουσιάζει τέτοια ικανότητα και γι' αυτό υπάρχει πιθανότητα να έχουμε παραγωγή προϊόντων με τυχαίες τοποθετήσεις νουκλεοτιδίων στις νέες αλυσίδες DNA (με μικρή συχνότητα) (Berg et al. 2002).

- **Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs).** Τα τέσσερα 5'-τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dATP, dCTP, dGTP και dTTP) είναι ουσιώδη δομικά στοιχεία για τη σύνθεση των νέων αλυσίδων. Προμηθεύουν τα μονονουκλεοτίδια που είναι απαραίτητα για την επιμήκυνση των εκκινητών, για την επίτευξη βέλτιστης ειδικότητας και πιστότητας σε υψηλούς ρυθμούς ενσωμάτωσης. Οι συγκεντρώσεις τους πρέπει να είναι από 20 έως 200 μM για κάθε δεοξυνουκλεοτίδιο και ισοδύναμες για κάθε ένα, για την ελαχιστοποίηση των λαθών.
- **Διάλυμα $MgCl_2$ κατάλληλης συγκέντρωσης.** Πρόκειται για διάλυμα $MgCl_2$ το οποίο παρέχει στην αντίδραση τα ιόντα Mg^{2+} που δρουν ως προσθετική ομάδα και είναι απαραίτητα για τη δράση του ενζύμου. Τα ιόντα Mg^{2+} προωθούν τις DNA/DNA αλληλεπιδράσεις και σχηματίζουν σύμπλοκα με τα dNTPs που είναι το υπόστρωμα για την πολυμεράση. Η απόδοση της αντίδρασης εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωση των ιόντων, εφόσον όταν αυτή είναι πολύ μικρή, οι εκκινητές δεν προσδένονται στο DNA στόχο, ενώ όταν είναι πολύ μεγάλη, το ζευγάρωμα των βάσεων γίνεται τόσο ισχυρό που τα νέα δίκλινα τμήματα δεν μπορούν να αποδιαταχθούν πλήρως ακόμα και στους 94°C (Williams 1989). Η συνήθης βέλτιστη συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+} είναι 3-6 mM (3 mM για την Real Time PCR).
- **Ρυθμιστικό διάλυμα.** Παρέχει τις κατάλληλες συνθήκες για την δράση του ενζύμου. Η σύνθεσή του ποικίλει και μπορεί να περιέχει τα εξής συστατικά: Tris-HCl που βοηθά στη ρύθμιση του pH (8,3-8,9 στους 20°C), KCl που διευκολύνει τον υβριδισμό των εκκινητών και επιταχύνει την σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου, κάποιο μη ιονικό απορρυπαντικό π.χ. Tween 20 που σταθεροποιεί την πολυμεράση (εξουδετερώνοντας όποια ποσότητα SDS έχει παραμείνει από την απομόνωση του DNA) και αποτρέπει την δημιουργία δευτεροταγών δομών και ζελατίνη ή βόεια αλβουμίνη που είναι απαραίτητη για τη λειτουργία και τη σταθερότητα του ενζύμου, για ενίσχυση της ειδικότητας και τη μεγαλύτερη παραγωγή του πολλαπλασιασθέντος προϊόντος.
- **ddH₂O.** Είναι διπλά αποστειρωμένο νερό, που προστίθεται στο μείγμα, μετά τον υπολογισμό του όγκου των παραπάνω διαλυμάτων, για να συμπληρώσει τον τελικό όγκο της αντίδρασης.

Μία αντίδραση PCR περιλαμβάνει συνεχώς επαναλαμβανόμενους κύκλους διαδοχικής αύξησης και μείωσης της θερμοκρασίας του μίγματος γενετικού υλικού και αντιδραστηρίων. Κάθε κύκλος ολοκληρώνεται σε τρία στάδια (Εικόνα 7) και

πραγματοποιείται με την βοήθεια ενός προγραμματιζόμενου θερμοκυκλοποιητή (PCR thermal cycler), ο οποίος ρυθμίζει αυτόματα την κατάλληλη, για κάθε στάδιο αντιγραφής θερμοκρασία, σύμφωνα με προεπιλεγμένο πρόγραμμα. Τα τρία στάδια είναι τα εξής:

- **1^ο στάδιο: Αποδιάταξη (Denaturation).** Το μίγμα θερμαίνεται στους 90° -95° C για χρονικό διάστημα από μερικά δευτερόλεπτα έως 2 λεπτά, ώστε να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου, που συνδέουν τις δυο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες του δίκλωνου DNA και για την παύση όλων των ενζυμικών αντιδράσεων όπως η σύνθεση των νέων κλώνων που λαμβάνει χώρα στο στάδιο της επιμήκυνσης εφόσον τα τρία στάδια επαναλαμβάνονται. Έτσι, προκύπτουν δύο μονόκλωνες αλυσίδες, που θα χρησιμεύσουν ως μήτρα για τη σύνθεση νέων συμπληρωματικών αλυσίδων. Αν η θερμοκρασία είναι χαμηλή ή αν η χρονική διάρκεια του σταδίου είναι μικρή, είναι δυνατό να αποτύχει η πλήρης αποδιάταξη γενωμικού DNA μεγάλου μοριακού βάρους. Έτσι προτείνεται το στάδιο της αποδιάταξης στην αρχή της αντίδρασης να είναι μεγαλύτερης διάρκειας, γιατί σε αυτό το σημείο είναι απαραίτητο να γίνει πλήρης αποδιάταξη. Η διαδικασία της αποδιάταξης είναι αντιστρεπτή και σε θερμοκρασία περίπου 25° C μπορεί να γίνει επανασύνδεση (renaturation) των δύο αλυσίδων.



Εικόνα 7. Τα στάδια της PCR και τρόπος λειτουργίας της μεθόδου.

- **2^ο στάδιο: Υβριδισμός των εκκινήτων (Primer annealing).** Η θερμοκρασία του μίγματος μειώνεται μεταξύ 50° C και 60° C για 30-60 δευτερόλεπτα. Θερμοκρασία χαμηλότερη από 45° C μπορεί να οδηγήσει σε μη ειδικές συνδέσεις και ελαττωμένη εξειδίκευση, ενώ θερμοκρασία άνω των 65° C οδηγεί σε ελαττωμένη ευαισθησία. Έτσι επιτυγχάνεται ο υβριδισμός των εκκινήτων με τις συμπληρωματικές προς αυτές μονόκλωνες DNA αλυσίδες, που προέκυψαν στο

πρώτο στάδιο. Οι εκκινητές εντοπίζουν το προς αντιγραφή τμήμα του DNA και προσανατολίζονται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε το 5' άκρο του καθένα να ενώνεται με το 3' άκρο της συμπληρωματικής αλυσίδας. Όσο πιο μεγάλη είναι η εξειδίκευση τόσο περισσότερο μπορεί να αυξηθεί η θερμοκρασία υβριδισμού. Συνήθως επιλέγεται η θερμοκρασία να είναι 5° C έως 10° C μικρότερη της Tm.

- **Τρίτο στάδιο: Επιμήκυνση (Extension).** Η θερμοκρασία αυξάνεται πάλι μεταξύ 70° και 75° C για 1 λεπτό και περιλαμβάνει την προσθήκη υπό την δράση της Taq πολυμεράσης, των συμπληρωματικών dNTPs στο 3' άκρο κάθε αλυσίδας. Ακολουθεί η επέκταση προς το 5' άκρο και με αυτόν τον τρόπο συνθέτονται δύο καινούργιες DNA αλυσίδες συμπληρωματικές με αυτές των δύο κλώνων του προτύπου DNA, με αποτέλεσμα το διπλασιασμό των δύο αρχικών. Η διαδικασία αντιγραφής εξελίσσεται, όπως προαναφέρθηκε, στην κατεύθυνση 5'→3', δηλαδή εντός των ορίων του τμήματος του γενώματος, το οποίο καθορίζουν οι δύο εκκινητές που αποτελούν και τα άκρα του.

Τα τρία παραπάνω στάδια αντιπροσωπεύουν ένα κύκλο PCR, ο οποίος ολοκληρώνεται σε 2-3 λεπτά περίπου, αν και αυτό εξαρτάται από το πόσο γρήγορα ο θερμοκυκλοποιητής επιτυγχάνει τις αυξομειώσεις της θερμοκρασίας στα προαναφερθέντα τρία στάδια αντιγραφής. Μετά το τέλος του πρώτου κύκλου η θερμοκρασία αυξάνεται και πάλι στους 95° C και ξεκινά ο δεύτερος κύκλος αντιγραφής. Συνήθως εκτελούνται 25-30 κύκλοι PCR. Ωστόσο, ο συνολικός αριθμός των κύκλων αντιγραφής εξαρτάται από τη συγκέντρωση των μορίων του DNA προτύπου. Σε κάθε κύκλο αντιγραφής, ως μήτρες χρησιμοποιούνται τόσο οι αρχικές όσο και οι καινούργιες DNA αλυσίδες που συντέθηκαν στους αμέσως προηγούμενους κύκλους. Επομένως, μετά το τέλος κάθε κύκλου η προϋπάρχουσα ποσότητα του DNA-προτύπου διπλασιάζεται. Εάν ο αριθμός των κύκλων είναι n , τότε η ποσότητα του DNA που αντιγράφεται αυξάνεται σε 2^n . Όταν η απόδοση του συστήματος είναι 100% η ποσότητα του προτύπου, μετά από 25-30 κύκλους, θα αυξηθεί κατά 33,6 εκατομμύρια έως 1 δισεκατομμύριο φορές περίπου, αντίστοιχα, μέσα σε 3 ώρες. Στην πραγματικότητα όμως, λόγω της προοδευτικής μείωσης της δραστηριότητας του ενζύμου και λόγω διάφορων άλλων παραγόντων, η απόδοση του συστήματος είναι πάντοτε μικρότερη. Έτσι, όταν η απόδοση είναι 80%, που θεωρείται ως μια σχετικά καλή απόδοση, τότε η ποσότητα του προτύπου, μετά από 30 κύκλους, αυξάνεται κατά 45,5 εκατομμύρια φορές.

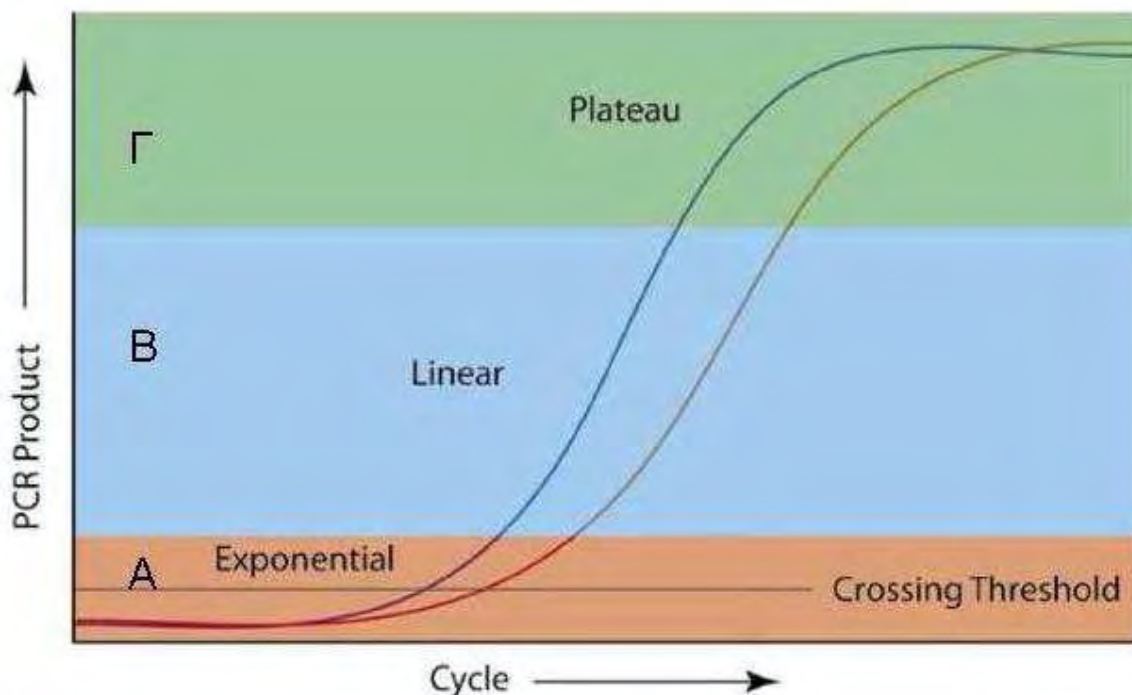
Μετά το τέλος του τελευταίου κύκλου συνήθως εφαρμόζεται ένα τελικό στάδιο επέκτασης (final extension), συνήθως, στους 72 °C, επί 5 λεπτά, ώστε να μεταπέσουν σε δίκλινα όλα τα μόρια DNA που έχουν παραχθεί.

Η διαδικασία της PCR χωρίζεται σε τρεις φάσεις (Εικόνα 8):

A) Εκθετική (exponential) φάση: Είναι η φάση κατά την οποία έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA. Σ' αυτή την φάση η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική και σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται η προεπιλεγμένη αλληλουχία DNA.

B) Γραμμική (linear) φάση: Η φάση στην οποία παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας DNA εξαιτίας της μείωσης της ενεργότητας των αντιδραστηρίων.

Γ) Φάση Plateau: Στη φάση αυτή έχει σταματήσει η αντίδραση της PCR καθώς και η παραγωγή νέων αντιγράφων εξαιτίας της εξάντλησης των αντιδραστηρίων.



Εικόνα 8. Η καμπύλη ενίσχυσης παρουσιάζει τις τρεις φάσεις στις οποίες χωρίζεται η διαδικασία της PCR. Α) Εκθετική φάση (Exponential phase), Β) Γραμμική φάση (Linear phase) και Γ) Φάση Πλατώ (Plateau) (Van Guilder et al. 2008).

Τρωτό σημείο της μεθόδου είναι η μεγάλη ευαισθησία της, με συνέπεια την πιθανή λήψη ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Αιτία των αποτελεσμάτων αυτών είναι η τυχαία μεταφορά απειροελάχιστης ποσότητας εξωγενούς νουκλεϊκού οξέος από ένα δείγμα σε άλλο με τα εργαλεία, τον αέρα ή τα αντιδραστήρια. Το νουκλεϊκό αυτό οξύ μπορεί να χρησιμεύει ως μήτρα κατά την αντιγραφή, αντί του επιθυμητού προτύπου. Η σωστή προετοιμασία του δείγματος αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για την αξιοπιστία της εξέτασης καθώς και εφαρμογή διαδικασιών ορθής εργαστηριακής πρακτικής. Μεγάλη ποσότητα νουκλεϊκών οξέων μπορεί να αναστείλει την αντίδραση. Αντιθέτως, καταστροφή με ενζυματικό ή χημικό τρόπο ενός αριθμού νουκλεϊκών οξέων στο δείγμα μπορούν να μειώσουν την ευαισθησία της μεθόδου. Τέλος, παράγοντες που δρουν ως αναστολείς της μεθόδου: παρουσία ενώσεων δισθενούς μαγνησίου, διάσπαση της αλληλουχίας-στόχου ή των εκκινητών και άμεση αναστολή της DNA πολυμεράσης.

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση PCR απεικονίζεται στη Εικόνα 9.



Εικόνα 9. Η συσκευή PCR που χρησιμοποιήθηκε.

Για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου 12S rRNA χρησιμοποιήσαμε τους εκκινητές 12S RNA Fw και 12S RNA Rv. Η αλληλουχία των εκκινητών παρουσιάζεται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων πρόβειου DNA

<i>Ovis aries</i>	Fw	AATGACGAAAGTAACCCTACAAT
	Rv	ATTTTGTITTTATAATTATTTGT

Για την διαδικασία της PCR το πρώτο βήμα είναι η παρασκευή ενός κοινού διαλύματος (master mix) το οποίο θα περιέχει, ανά δείγμα, τις ποσότητες αντιδραστηρίων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 11. Το διάλυμα παρασκευάζεται ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων. Έπειτα τοποθετούμε σε φιαλίδια erppendorf 2μl εκμαγείου DNA το οποίο αντιστοιχεί σε ποσότητα 40-100ng.

Πίνακας 11. Συστατικά αντίδρασης PCR

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μl)	Συγκεντρώσεις
DNA	2,0	40-100 ng
ddH ₂ O	38,8	-
Buffer 10X	5,0	1X
MgCl ₂ (100mM)	1,0	2mM
dNTPs (40mM)	1,0	0,2mM
Primer Fw (50 pmol/μl)	1,0	1 pmol/μl
Primer Rv (50 pmol/μl)	1,0	1 pmol/μl
Taq DNA (5U/μl)	0,2	0,05 units
Συνολικός όγκος αντίδρασης (μl)	50,0	

Στην συνέχεια μοιράζουμε σε κάθε erppendorf που περιέχει το DNA, από 48μl του master mix. Επίσης, σε ένα erppendorf το οποίο δεν περιέχει DNA βάζουμε master mix (μάρτυρας) ώστε να συγκρίνουμε το προϊόν PCR με τον μάρτυρα. Τέλος, τοποθετούμε τα δείγματα στον θερμοκυκλοποιητή ο οποίος προγραμματίζεται να εκτελέσει το επιθυμητό πρόγραμμα θερμοκρασίας /χρόνου.

Αρχική αποδιάταξη: 95° C για 4min

Αποδιάταξη: 95° C για 40sec

Θερμική Επαναδιάταξη: 53° C για 50sec

Επιμήκυνση: 72° C για 40sec

} 40 κύκλοι

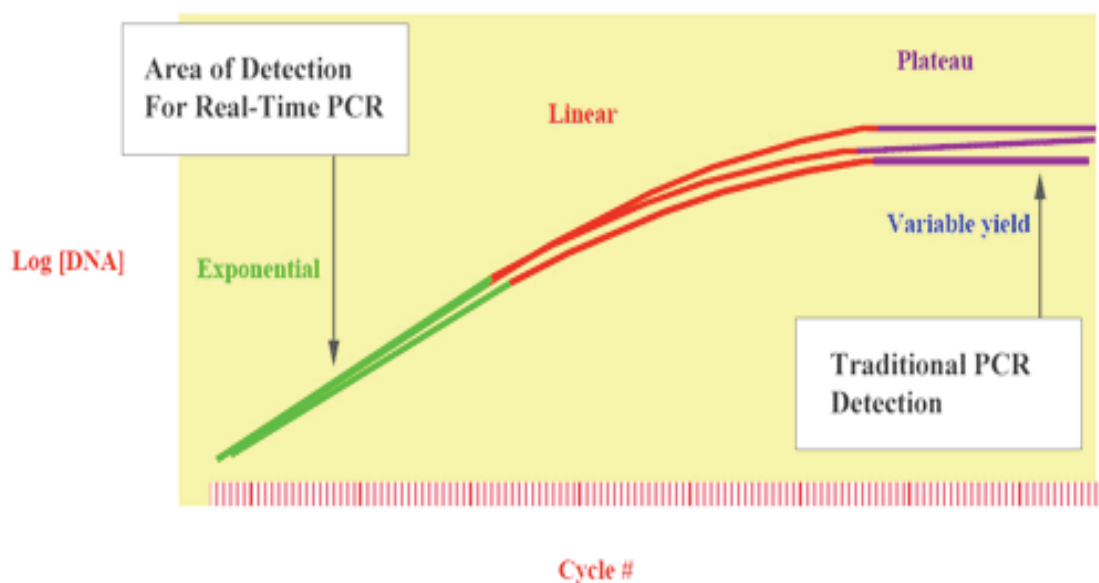
Τελική επιμήκυνση: 72° C για 10min

Μετά το πέρας της PCR γίνεται ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, για να ελέγξουμε την επιτυχία της διαδικασίας, όπως αναφέραμε προηγουμένως στην παράγραφο για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη.

6.5 Real Time PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο)

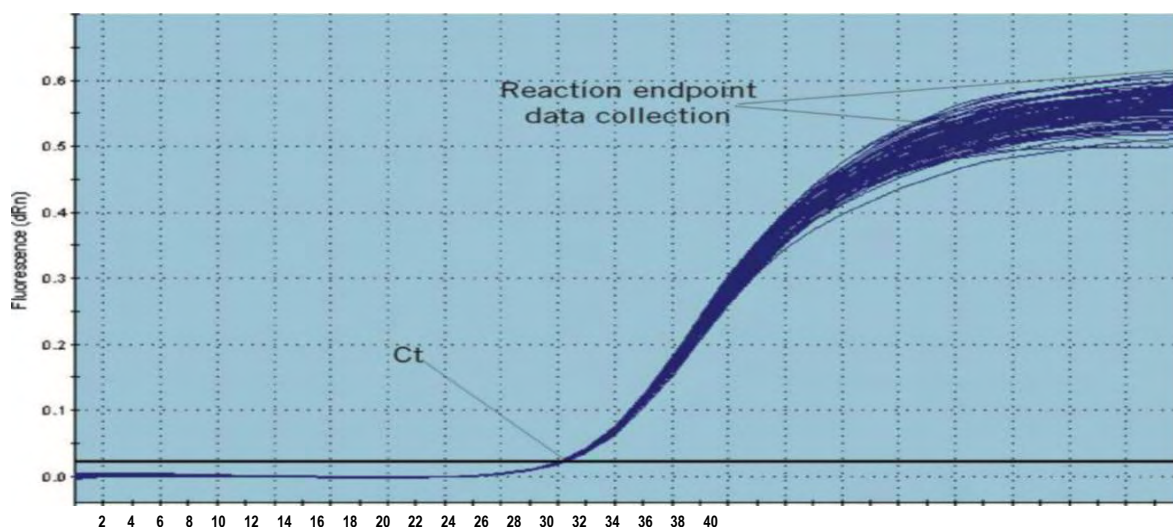
Η μέθοδος της Real-Time PCR αποτελεί μια παραλλαγή της συμβατικής μεθόδου PCR. Είναι μία γρήγορη, αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό, την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων σε πραγματικό χρόνο. Αναφέρεται επίσης και ως ποσοτική PCR (quantitative Real-time PCR, q-PCR). Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της εξέλιξης της αντίδρασης σε όλα τα στάδιά της. Το διάλυμα της Real-time PCR περιέχει τα ίδια αντιδραστήρια με αυτό της συμβατικής μεθόδου και επιπλέον κάποιες χρωστικές για την ανίχνευση του γονιδίου στόχου.

Η μέθοδος PCR μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού της αν ενσωματώσουμε εσωτερικό ανιχνευτή φθορισμού και μετρήσουμε την ένταση του φθορισμού. Το σημείο που επιλέγεται για να μετρηθεί η ένταση του φθορισμού για να υπολογιστεί η αρχική ποσότητα DNA είναι κατά την εκθετική φάση της ενίσχυσης (Real time PCR) όπως φαίνεται και στην Εικόνα 10.



Εικόνα 10. Το σημείο όπου μετριέται η ένταση του φθορισμού στην PCR και στην Real-time PCR.

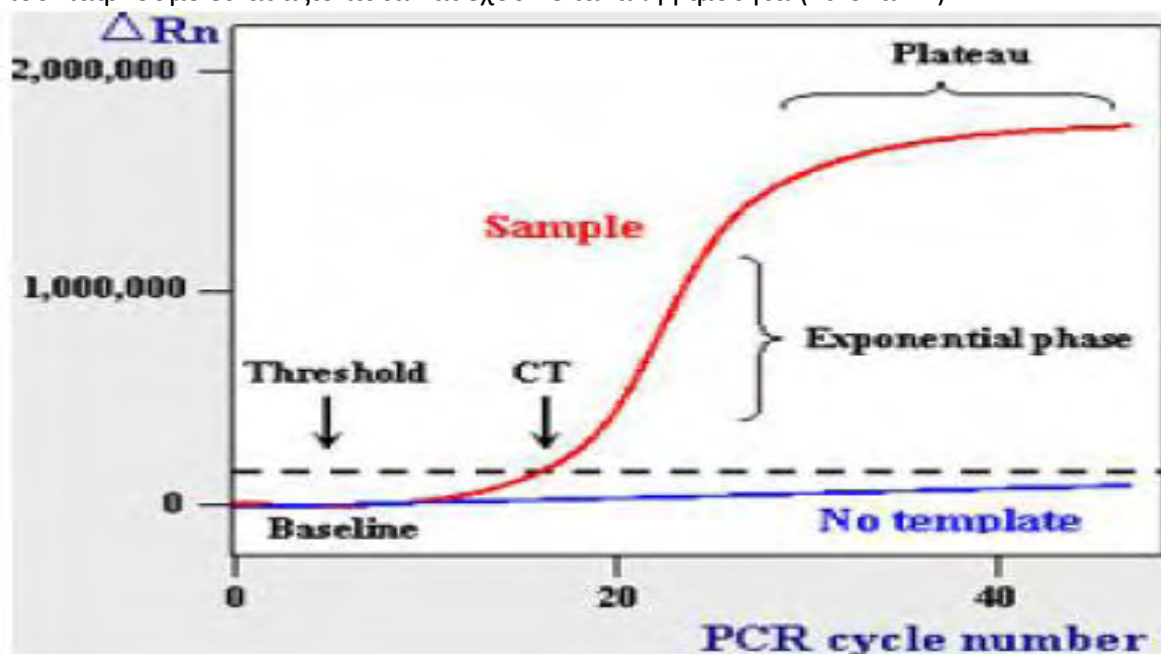
Το αποτέλεσμα της ποσοτικής ανάλυσης της συμβατικής είναι ασυνεπές γιατί η αποδοτικότητα της αντίδρασης μειώνεται τους τελευταίους κύκλους της αντίδρασης καθώς τα αντιδραστήρια εξαντλούνται και συσσωρεύονται αναστολείς. Οι παραπάνω επιδράσεις διαφέρουν από δείγμα σε δείγμα και έχουμε διαφορετικές τιμές φθορισμού οι οποίες δεν σχετίζονται με τις αρχικές πρότυπες συγκεντρώσεις. Έτσι όπως φαίνεται και στην Εικόνα 11 έχουμε μεγάλη διασπορά αποτελεσμάτων τα οποία δεν είναι ούτε ομοιόμορφα ούτε παρουσιάζουν επαναληψιμότητα και συνεπώς δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ακριβείς μετρήσεις ποσοτικής ανάλυσης παρά μόνο για ποιοτικές αναλύσεις.



Εικόνα 11. Διακύμανση αποτελεσμάτων ποσοτικής ανάλυσης με συμβατική PCR σε πολλές ταυτόσημες αντιδράσεις.

Με την Real-time PCR ο φθορισμός μετριέται σε κάθε κύκλο της, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης. Πρόκειται για μία γραφική αναπαράσταση του σήματος του φθορισμού συναρτήσει του κύκλου πολλαπλασιασμού. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση μπαίνει στη γραμμική φάση, κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους. Οι μετρήσεις για

την ποσοτικοποίηση αφορούν στην εκθετική φάση της αντίδρασης γιατί τα αποτελέσματα που παίρνουμε είναι αξιόπιστα και έχουν επαναληψιμότητα (Εικόνα 12).

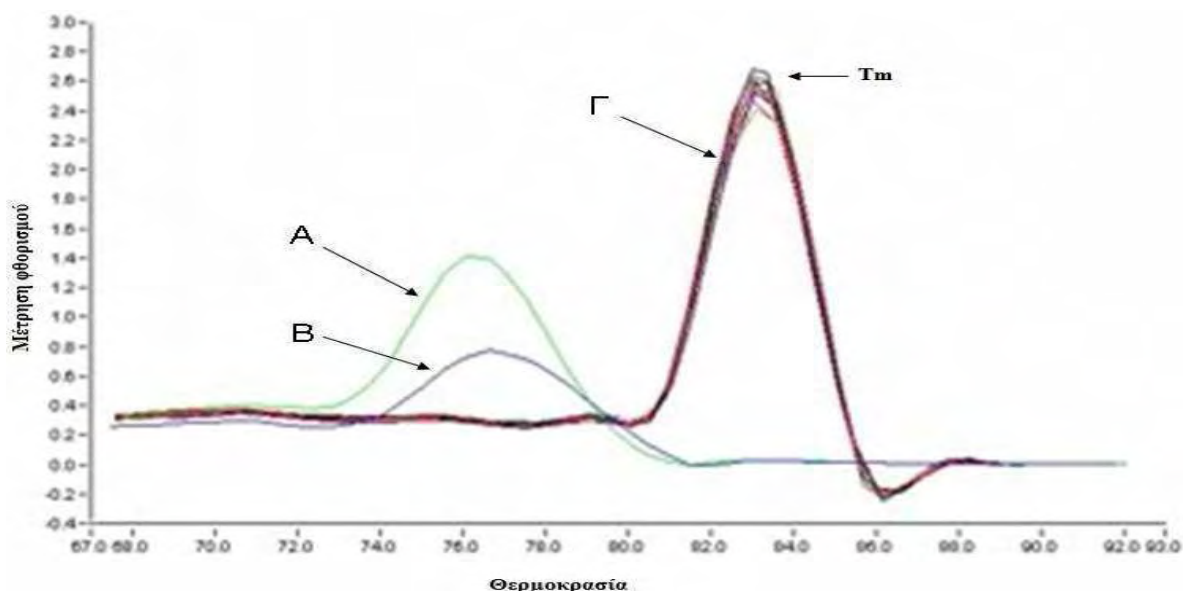


Εικόνα 12. Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης, όπου διακρίνονται η εκθετική, η γραμμική και η φάση κορεσμού. Το όριο φθορισμού που τίθεται για τον προσδιορισμό της τιμής Ct, ορίζεται έτσι ώστε να βρίσκεται πάνω από το βασικό επίπεδο (baseline) και στην αρχή της εκθετικής φάσης. Στον οριζόντιο άξονα παριστάνεται ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης, ενώ στον κατακόρυφο η τιμή των επιπέδων φθορισμού.

Το κατώφλι φθορισμού (threshold) είναι το σημείο στο οποίο το φθορίζον σήμα των προϊόντων της Real-time PCR ξεχωρίζει έντονα από το υπόβαθρο, ενώ ο αριθμός του κύκλου της αντίδρασης κατά την διάρκεια του οποίου ο παρατηρούμενος φθορισμός προσεγγίζει το κατώφλι αποτελεί την τιμή Ct (threshold cycle) και σε αυτόν λαμβάνονται οι τιμές που χρησιμοποιούνται για τους υπολογισμούς. Στο επίπεδο αυτό γίνεται η ανάλυση των δεδομένων. Το κατώφλι φθορισμού καθορίζεται αυτόματα ή από τον ερευνητή, στο επίπεδο όπου ο ρυθμός παραγωγής προϊόντος είναι ο υψηλότερος κατά την εκθετική φάση. Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (Wong et al. 2005). Ως γραμμή υπόβαθρου (baseline) ορίζονται οι κύκλοι PCR κατά τους οποίους το σήμα του φθορισμού συσσωρεύεται μεν αλλά είναι κάτω από τα όρια ανίχνευσης του μηχανήματος (Εικόνα 12).

Με την Real time PCR, εκτός από την ποσοτική ανάλυση του προϊόντος της PCR, γίνεται και ποιοτική ανάλυση με βάση τη μελέτη της καμπύλης αποδιάταξης του προϊόντος (melting curve analysis), με την οποία μπορούν να αξιολογηθούν τα προϊόντα της αντίδρασης, δηλαδή να δούμε αν τα προϊόντα που παρήχθησαν είναι αυτά που θέλουμε. Η καμπύλη βασίζεται στη θερμοκρασία αποδιάταξης (T_m) των προϊόντων της αντίδρασης (Houghton et al. 2006). Τα προϊόντα της αντίδρασης θα πρέπει να έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης. Σε διαφορετική περίπτωση υπάρχει επιμόλυνση ή προϊόντα που προέρχονται από ένωση μεταξύ των εκκινητών ή προϊόντα που προέρχονται από υβριδοποίηση των εκκινητών με παρόμοιες συμπληρωματικές αλληλουχίες (mispriming) (Hunt 2006). Αν τα προϊόντα έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης, θα

εμφανιστεί μία κορυφή στην καμπύλη, ενώ σε περίπτωση που ανάμεσα στα προϊόντα υπάρχουν και τμήματα διαφορετικού μεγέθους τότε θα παρατηρηθούν και άλλες κορυφές που θα αντιστοιχούν σε διαφορετικές θερμοκρασίες αποδιάταξης (Εικόνα 13), λόγω του γεγονότος ότι κάθε προϊόν έχει διαφορετική θερμοκρασία αποδιάταξης.



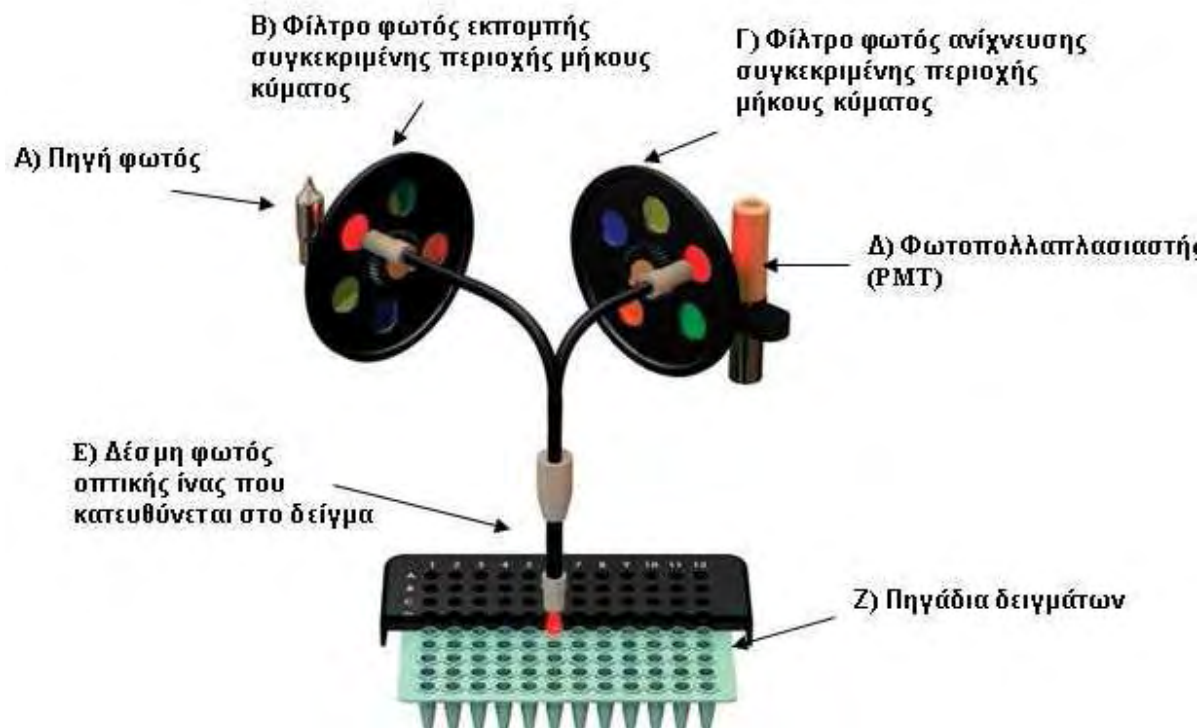
Εικόνα 13. Παράδειγμα καμπύλης αποδιάταξης προϊόντος όπου εμφανίζονται τρεις διαφορετικές κορυφές (Α, Β και Γ). Η κορυφή Γ αντιστοιχεί στη θερμοκρασία αποδιάταξης του επιθυμητού προϊόντος. Οι κορυφές Α και Β αντιστοιχούν σε διαφορετικές θερμοκρασίες αποδιάταξης.

Στις αντιδράσεις της Real-time PCR για να πάρουμε πιο ακριβή αποτελέσματα θα πρέπει να χρησιμοποιήσουμε δείγματα ελέγχου που διακρίνονται σε θετικά και αρνητικά. Τα θετικά δίνουν συνεχείς αναδιπλασιασμούς με συνέπεια την παραγωγή προϊόντων και την συνεχή αναλογική αύξηση της έντασης του φθορισμού. Αν δεν συμβαίνουν τα παραπάνω υποδηλώνεται ότι υπάρχει κάποιο πρόβλημα στην αντίδραση ή στα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια. Αντίθετα, τα αρνητικά δείγματα, περιέχουν όλα τα συστατικά του διαλύματος της αντίδρασης εκτός του DNA, δεν δίνουν προϊόντα αναδιπλασιασμού και συνεπώς δεν παρατηρείται αύξηση του φθορισμού ενώ σε διαφορετική περίπτωση υποδηλώνει πιθανή επιμόλυνση των δειγμάτων, μη ειδικό σχηματισμό προϊόντων ή υποβάθμιση των ανιχνευτών. Για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν αρνητικά δείγματα μαζί με τα προς εξέταση δείγματα.

Η λειτουργία της τεχνολογίας της Real-time PCR βασίζεται στη χρήση μηχανισμών ανίχνευσης, με την βοήθεια ειδικών χρωστικών που διεγείρονται και εκπέμπουν συγκεκριμένου μήκους κύματος φως, όπως η SYBR green καθώς και ανιχνευτών (probes), αλλά και στις ειδικά διαμορφωμένες συσκευές Real-Time PCR που χρησιμοποιούνται για την εφαρμογή της. Οι συσκευές βασίζονται τόσο στο σύστημα ανίχνευσης που διαθέτουν, όσο και στο ειδικό λογισμικό με το οποίο αναλύονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Η μέτρηση της ποσότητας DNA που παράγεται μετά από κάθε κύκλο γίνεται μέσω σήμανσης των αντιγράφων με φθορίζοντα μόρια ή ανιχνευτές που έχουν ενσωματωθεί στο τελικό προϊόν. Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται ανάλογα με τον αριθμό των παραγόμενων αντιγράφων σε κάθε θερμοδυναμικό κύκλο της αντίδρασης (Stratagene 2006). Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή του πειράματος της παρούσας εργασίας είναι το μοντέλο MX Pro 3005 P της εταιρείας Stratagene. Το Mx3005P είναι ένα σύστημα QPCR που έχει την δυνατότητα

διεξαγωγής αντίδρασης Real-Time QPCR και PCR, ολοκλήρωσης της αντίδρασης σε 40 κύκλους και διαχωρισμό δειγμάτων με 5000 και 10000 αντίγραφα της αλληλουχίας με ποσοστό βεβαιότητας 99,7%. Το οπτικό σύστημα του Mx3005P αποτελείται από την πηγή φωτός (λάμπα), τα φίλτρα και την κεφαλή ανίχνευσης (Εικόνα 14). Η συσκευή Mx3000P είναι συνδεδεμένη με ένα υπολογιστή που συλλέγει και αναλύει τα δεδομένα της αντίδρασης. Τα διάφορα μέρη του οργάνου περιγράφονται παρακάτω (Εικόνα 14):

- Πηγή φωτός: Η πηγή φωτός είναι σημαντικό κομμάτι στην συσκευή γιατί σ' αυτή βασίζεται η παραγωγή του φθορισμού στον οποίο στηρίζεται η ανίχνευση των δεδομένων. Η πηγή φωτός της συσκευής Mx3005P αποτελείται από μία λάμπα αλογόνου-βολφραμίου με χαλαζία που προσφέρει μεγάλο εύρος διέγερσης. Το φως που εκπέμπεται από τις διεγερμένες χρωστικές του δείγματος περνάει πρώτα από φίλτρα πριν διοχετευθεί στο σύστημα ανίχνευσης και παρουσιάζει εύρος διέγερσης 350 με 750nm.
- Είδη φίλτρων, αριθμός και ποιότητα φωτός: η συσκευή φέρει ένα τροχό με 5 διαφορετικά φίλτρα, τα οποία προεπιλέγονται από τον χρήστη του Mx3005P. Υπάρχουν πολλές επιλογές σε χρωστικές από τις οποίες μπορεί να διαλέξει ο χρήστης. Μία από αυτές τις χρωστικές με το αντίστοιχο εύρος διέγερσης τους είναι η FAM™/ SYBR Green I (492nm-516nm). Τα φίλτρα αυτά χρησιμοποιούνται στο οπτικό σύστημα και στο σύστημα ανίχνευσης, για να εμποδίζουν την παρεμβολή εξωτερικού σήματος στο σήμα που εκπέμπουν τα δείγματά μας και έτσι να έχουμε ένα καθαρό σήμα.
- Ανίχνευση και συστήματα ανίχνευσης: Το σύστημα ανίχνευσης αποτελείται από οπτικές ίνες και ένα σωλήνα ανίχνευσης, τον φωτοπολλαπλασιαστή (PMT). Η δέσμη των οπτικών ινών παρέχει διπλή λειτουργία, μεταφέρει το φως που περνάει από την λάμπα και τα φίλτρα αλλά και μεταφέρει το φθορίζον σήμα που εκπέμπεται από κάθε δείγμα προς τον ανιχνευτή. Το σύστημα αυτό προσφέρει μέγιστη ένταση με μικρή απώλεια σήματος και σε συνδυασμό με τα φίλτρα εκπομπής ανιχνεύει το σήμα που εκπέμπει το κάθε πηγάδι αποβάλλοντας τυχόν εξωτερικά σήματα.
- Πηγάδια δειγμάτων: Η συσκευή Mx3005P διαθέτει ένα σύστημα θερμαινόμενης πλάκας (thermal block) που αποτελείται από 96 πηγάδια δειγμάτων. Η θερμαινόμενη αυτή πλάκα είναι φτιαγμένη με σύστημα θέρμανσης Peltier και μπορεί να δεχθεί σωλήνες τύπου eppendorf όγκου έως 200μl. Το σύστημα Peltier διασφαλίζει ομοιόμορφη θέρμανση της όλης της πλάκας καθ όλη την διάρκεια της αντίδρασης για την καλύτερη απόδοση της εφαρμογής.



Εικόνα 14. Αναλυτική περιγραφή των τμημάτων που αποτελούν την συσκευή Mx Pro 3005P της εταιρίας Stratagene (Stratagene, 2007).

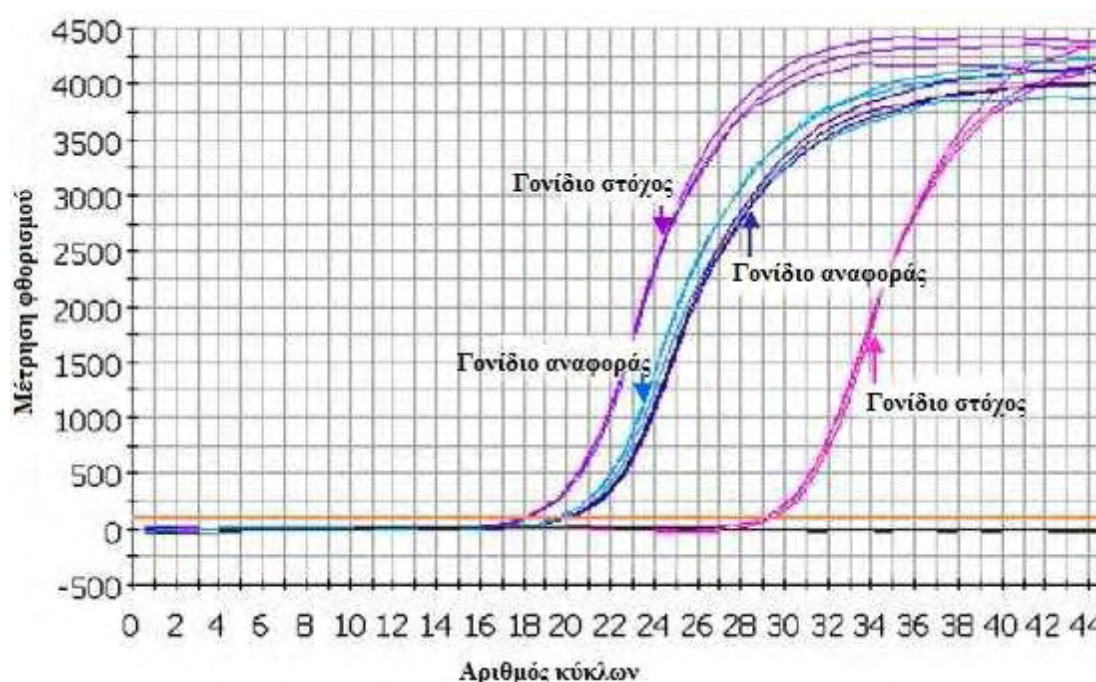
- **Λογισμικό:** Το λογισμικό του Mx3005P παρέχει την δυνατότητα επεξεργασίας του σήματος ανίχνευσης για την χρήση έως και 5 διαφορετικών χρωστικών ταυτόχρονα, ενώ παρακολουθεί την πορεία της ενίσχυσης του σήματος εκπομπής σε πραγματικό χρόνο και αναλύει τα δεδομένα κατά την διάρκεια της PCR. Άλλες δυνατότητες του λογισμικού είναι ο αυτόματος υπολογισμός της θερμοκρασίας αποδιάταξης για την ανάλυση με καμπύλη αποδιάταξης, απόδοση όλων των διαφορετικών χρωστικών από διαφορετικά πειράματα σε διαφορετικά γραφήματα ενίσχυσης ή σε ένα γράφημα ενίσχυσης. Υπάρχει η δυνατότητα το λογισμικό να συνδεθεί με διαφορετικά μηχανήματα (έως 6) σε ένα μόνο υπολογιστή (Stratagene, 2007).
- **Είδη ανάλυσης:** Η συσκευή Mx3005P προσφέρει μέσω του λογισμικού που διαθέτει διάφορα είδη ανάλυσης. Ορισμένα είδη ανάλυσης είναι: 1) οι καμπύλες ενίσχυσης (amplification plot) που δείχνουν την σχέση μεταξύ του αριθμού των κύκλων και της τιμής φθορισμού που δίδει κάθε δείγμα, 2) γράφημα της καμπύλης αναφοράς (standard curve) που δείχνει σε μορφή καμπύλης την σχέση μεταξύ των υπό μελέτη δειγμάτων και δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης, 3) καμπύλη αποδιάταξης (melting curve) που εμφανίζει την θερμοκρασία στην οποία αποδιάτάχθηκε κάθε δείγμα και 4) τελική αναφορά στην οποία εμφανίζονται όλα τα δεδομένα των δειγμάτων που έλαβαν μέρος στην αντίδραση.

6.5.1 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

Ανάλογα με τον σκοπό του πειράματος, αν δηλαδή απαιτείται να υπολογιστεί η σχετική ποσότητα DNA ή ο ακριβής αριθμός αντιγράφων, υπάρχουν δυο διαφορετικές μέθοδοι ποσοτικοποίησης που μπορούν να επιλεγθούν. Οι μέθοδοι αυτές είναι: Απόλυτη

ποσοτικοποίηση (Absolute quantification) και Σχετική ποσοτικοποίηση (Relative quantification) (Livak et al. 2001).

Η σχετική ποσοτικοποίηση (Relative quantification) είναι πιο εύκολη στη χρήση της σε σχέση με την απόλυτη και με την μέθοδο αυτή δεν είναι απαραίτητη η χρήση της καμπύλης αναφοράς. Χρησιμοποιείται όταν δεν είναι απαραίτητο να μετρηθεί με ακρίβεια η αρχική ποσότητα της αλληλουχίας στο δείγμα. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην σύγκριση της έντασης φθορισμού του υπό μελέτη γονιδίου μετά από αλυσιδωτή ενίσχυση με εκείνη ενός γονιδίου αναφοράς (reference ή control gene) του ίδιου οργανισμού στην ίδια αντίδραση (Pfaffl 2002, Εικόνα 15). Έχουν αναπτυχθεί διάφορα μαθηματικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται για να υπολογίσουμε την έκφραση του υπό μελέτη γονιδίου σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου αναφοράς (π.χ. το μαθηματικό μοντέλο του Pfaffl 2002).

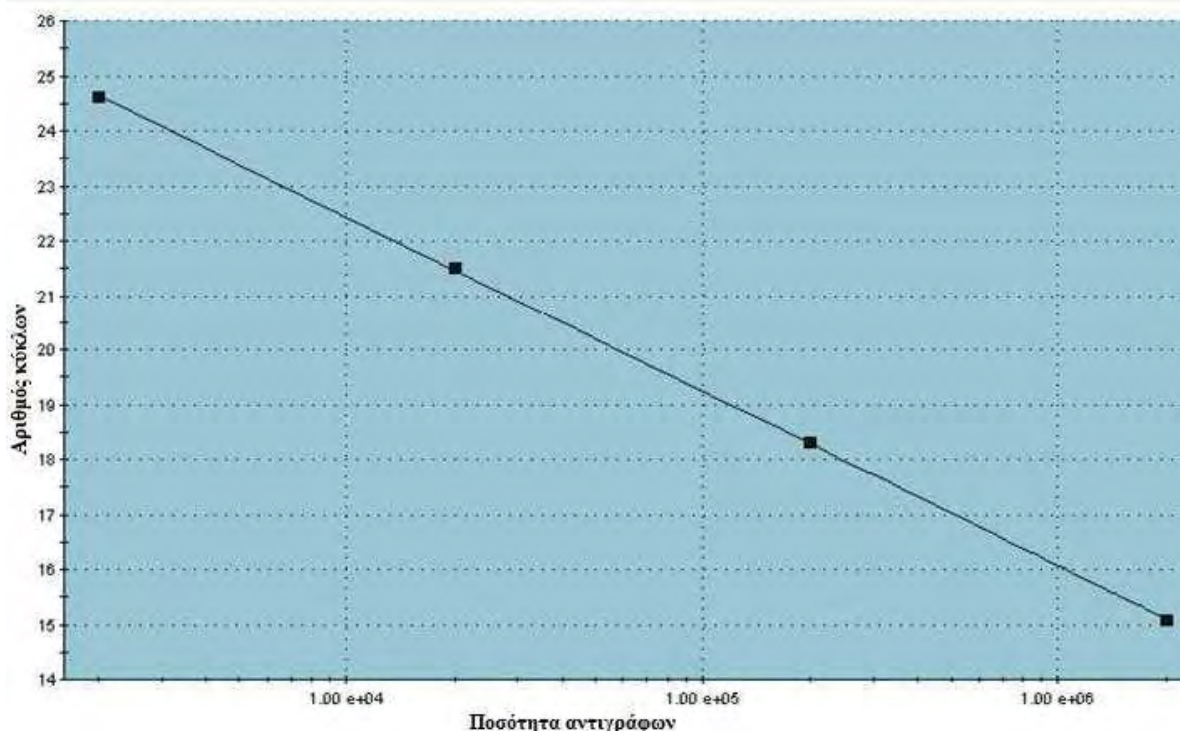


Εικόνα 15. Σύγκριση καμπύλης του υπό μελέτη γονιδίου (γονίδιο-στόχος) με το γονίδιο αναφοράς (Hunt 2006).

Η Απόλυτη ποσοτικοποίηση (Absolute quantification) παρέχει τη μεγαλύτερη ακρίβεια στην ποσοτικοποίηση δειγμάτων της Real time PCR και χρησιμοποιείται όταν είναι απαραίτητο να μετρηθεί η ακριβής ποσότητα της αλληλουχίας στο δείγμα. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χρήση μίας καμπύλης αναφοράς (standard curve, Εικόνα 16), με την οποία συγκρίνεται το φθορίζον σήμα που εκπέμπεται κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Για την δημιουργία της καμπύλης αναφοράς θα πρέπει να επιλεγεί μια γνωστή συγκέντρωση του γονιδίου-στόχου ("μάρτυρας"), που μπορεί να προέρχεται από DNA, γενωμικό DNA, RNA, cDNA, ανασυνδυασμένο (recombinant) πλασμιδιακό DNA (recDNA) ή συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (Stratagene 2006). Αυτή η συγκέντρωση-μάρτυρας θα υποβληθεί σε μια σειρά διαδοχικών αραιώσεων και στη συνέχεια τα αραιωμένα δείγματα θα περάσουν από τις ίδιες συνθήκες της Real-Time PCR μαζί με τα πειραματικά δείγματα

Μετά το τέλος της αντίδρασης η καμπύλη αναφοράς εμφανίζεται σε γράφημα ως μια ευθεία γραμμή που συσχετίζει τις τιμές Ct για κάθε αραιώση με το λογάριθμο της

συγκέντρωσης του αραιωμένου δείγματος. Η καμπύλη αναφοράς πρέπει να βασίζεται σε τουλάχιστον 4 σημεία γνωστής συγκέντρωσης και θα πρέπει τα σημεία αυτά να καλύπτουν το εύρος των συγκεντρώσεων των υπό μελέτη δειγμάτων. Στην περίπτωση που δεν καλύπτει όλο το εύρος των συγκεντρώσεων τότε μπορεί η ποσοτικοποίηση των υπό μελέτη δειγμάτων να μην είναι αξιόπιστη (Stratagene 2006). Αν η καμπύλη αναφοράς τείνει να γίνει μη γραμμική σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, αυτό υποδηλώνει ότι έχει φτάσει στο όριο ανίχνευσης για την συγκεκριμένη δοκιμή. Στη συνέχεια μπορεί με την βοήθεια της συσκευής της Real-time PCR να γίνει σύγκριση των τιμών Ct των πειραματικών δειγμάτων με αυτές της καμπύλης αναφοράς και έτσι να ποσοτικοποιηθούν τα άγνωστα δείγματα (Stratagene-, 2006).



Εικόνα 16. Παράδειγμα καμπύλης αναφοράς (standard curve) που σχηματίζεται από τέσσερα σημεία, δηλαδή από τέσσερις αραιώσεις του αρχικού μάρτυρα (Stratagene 2006).

Ο συντελεστής συσχέτισης (Correlation coefficient, R^2) αποτελεί ένα μέτρο του πόσο καλά ταιριάζουν κάθε φορά τα δεδομένα στην καμπύλη αναφοράς. Επί της ουσίας, η τιμή του R^2 εκφράζει την γραμμικότητα της καμπύλης και στην ιδανική περίπτωση είναι $R^2=1$, ενώ στην πραγματικότητα η μέγιστη τιμή του είναι 0,999.

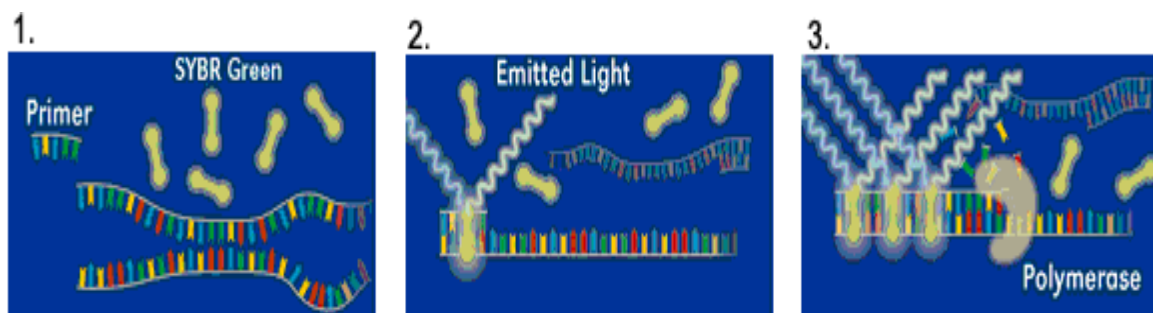
Η αποτελεσματικότητα (Efficiency, E) της Real-time PCR πρέπει να είναι όσο πιο κοντά γίνεται στο 100%, για την εξασφάλιση αξιόπιστων και επαναλήψιμων αποτελεσμάτων. Η απόδοση υπολογίζεται από την τιμή της κλίσης (slope) της πρότυπης καμπύλης, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$E_{(\text{Efficiency})} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

Η ιδανική τιμή $E=100\%$ δείχνει ότι το γονίδιο-στόχος διπλασιάζεται μετά από κάθε κύκλο, κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης της αντίδρασης. Κάποιοι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά την αποτελεσματικότητα ($E < 90\%$) είναι η χρήση μη κατάλληλων συγκεντρώσεων των αντιδραστηρίων, η ποιότητα του ενζύμου, καθώς και η ίδια η δυναμική της αντίδρασης. Τιμές E μεταξύ 90 -110% που αντιστοιχούν σε τιμές κλίσης από -3,58 έως -3,10 υποδεικνύουν μια καλή αντίδραση.

6.5.2 Αναλυτικές μέθοδοι για την Real Time PCR με βάση τις φθορίζουσες χρωστικές ουσίες SYBR Green

Στην παρούσα εργασία το πειραματικό πρωτόκολλο της Real-Time PCR βασίστηκε στη χρήση και ανίχνευση της χρωστικής SYBR green. Στις μεθόδους αυτές χρησιμοποιείται μια φθορίζουσα χρωστική, η οποία ενσωματώνεται σε δίκλωνο μόριο DNA (dsDNA). Μια τέτοια ευρέως χρησιμοποιούμενη χρωστική είναι η SYBR green I. Πρόκειται για μια ασύμμετρη κυανίνη η οποία προσδένεται στην ελάσσονα αύλακα της δίκλωνης έλικας του DNA. Η ουσία αυτή διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497 nm και εκπέμπει στα 520 nm. Σημειώνεται ότι η SYBR green I δεν φθορίζει όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα. Ωστόσο, η ενσωμάτωσή της στο DNA κατά τη σύνθεσή του, έχει ως αποτέλεσμα αλλαγή της στερεοδιάταξης του μορίου της και την παραγωγή φθορισμού χίλιες φορές πιο ισχυρού από την αδέσμευτη χρωστική. Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος (Stratagene 2006). Επομένως η ένταση του φθορισμού σε κάθε βήμα της αντίδρασης PCR αυξάνει καθώς αυξάνει και η συγκέντρωση του προϊόντος (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Τρόπος λειτουργίας της μεθόδου Real-Time PCR με τη χρήση της χρωστικής SYBR green I.

Η χρήση της SYBR green παρουσιάζει τόσο πλεονεκτήματα όσο και μειονεκτήματα. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημά της είναι η δυνατότητα χρήσης της με οποιοδήποτε ζευγάρι εκκινητών, για την ενίσχυση οποιασδήποτε αλληλουχίας-στόχου, γεγονός που την καθιστά πολύ πιο οικονομική μέθοδο από την χρήση ειδικού ανιχνευτή (probe). Επιπλέον, συνιστά μια ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδο, καθώς σε κάθε μόριο DNA που συντίθεται δεσμεύονται πολλά μόρια χρωστικής, με αποτέλεσμα την ενίσχυση του προκύπτοντος σήματος. Αντίθετα, σημαντικό μειονέκτημα της SYBR green αποτελεί το γεγονός ότι δεν παρουσιάζει εξειδίκευση και μπορεί να προσδένεται σε όλα τα δίκλιωνα μόρια DNA που συντίθενται κατά την αντίδραση ενίσχυσης, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα πιθανά διμερή των εκκινητών καθώς και μη ειδικά προϊόντα που ενδέχεται να προκύπτουν. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε λανθασμένη υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης της αλληλουχίας-στόχου λόγω της τεχνητής αύξησης του φθορισμού. Παρ' όλ' αυτά υπάρχει τρόπος να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί. Ο σωστός σχεδιασμός ειδικών εκκινητών όπως επίσης και η βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης, μπορούν να συμβάλλουν στην αποτροπή δημιουργίας διμερών των εκκινητών. Επιπλέον, η μελέτη των καμπύλων αποδιάταξης (melting curves) μετά το πέρας της αντίδρασης, δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού του φθορισμού που προέκυψε από την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου από τους φθορισμούς που οφείλονται στα διμερή των εκκινητών ή σε μη ειδικά προϊόντα.

Για την διαδικασία της Real Time PCR με την χρωστική SYBR Green το πρώτο βήμα είναι η δημιουργία ενός κοινού διαλύματος (master mix). Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις παρουσιάζονται στους Πίνακες 12 και 13.

Πίνακας 12. Συστατικά αντίδρασης Real Time PCR με SYBR Green και συγκέντρωση εκκινητών 200 nM

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
SYBR Green	21,5 µl
Primer Fw (10µM)	0,9 µl
Primer Rv (10µM)	0,9 µl
ddH ₂ O	16,7 µl
DNA	3,0 µl
Συνολικός όγκος	43,0 µl

Πίνακας 13. Συστατικά αντίδρασης Real Time PCR με SYBR Green και συγκέντρωση εκκινητών 300 nM

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
SYBR Green	21,5 µl
Primer Fw (10µM)	1,3 µl
Primer Rv (10µM)	1,3 µl
ddH ₂ O	15,9 µl
DNA	3,0 µl
Συνολικός όγκος	43,0 µl

Επίσης, σε ένα erppendorf το οποίο δεν περιέχει DNA βάζουμε master mix (μάρτυρας) ώστε να συγκρίνουμε το προϊόν PCR με τον μάρτυρα. Αμέσως μετά χωρίζουμε την ποσότητα του κάθε erppendorf στην μέση, δηλαδή 21 µl και την τοποθετούμε στα ειδικά erppendorf για την Real-Time PCR και τα τοποθετούμε στην συσκευή η οποία προγραμματίζεται να εκτελέσει το επιθυμητό πρόγραμμα θερμοκρασίας / χρόνου για 30 κύκλους, συμπεριλαμβάνοντας και ένα τελικό πρόγραμμα για την καμπύλη αποδιάταξης (dissociation curve).

Για την ανίχνευση χρησιμοποίησης αγελαδινού γάλακτος σε τυρί Φέτα για την αντίδραση Real Time PCR με SYBR Green χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα που αναφέρεται στον Πίνακα 14.

Για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου 12S rRNA για την ανίχνευση του αγελαδινού γάλακτος χρησιμοποιήσαμε τους παρακάτω εκκινητές που είναι ειδικοί για την ενίσχυση του 12SrRNA τους είδους *Bos Taurus* (Πίνακας 15).

Πίνακας 14 Συστατικά αντίδρασης Real Time PCR με SYBR Green και συγκέντρωση εκκινητών 300 nM για ανίχνευση παρουσίας αγελαδινού γάλακτος

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
SYBR Green	10 µl
Primer Fw (300nM)	0,6 µl
Primer Rv (300nM)	0,6 µl
ddH ₂ O	6,8 µl
DNA	2 µl

Πίνακας 15. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων DNA βοδινού

12S rRNA Fw	5' - ATGACGAAAGTGACCCTACAATAGCC-3'
12S rRNA Rv	5' - ATTTTGTATTATGTAATTATCTGT-3'

Το πρόγραμμα θερμοκρασίας/χρόνου που εκτέλεσε η συσκευή για 30 κύκλους ήταν το παρακάτω:

95° C για 5 min	→	αρχικό στάδιο αποδιάταξης
95° C για 15 sec	}	για 30 κύκλους
60° C για 1 min		
95° C για 1 min	}	συνέχεια για καμπύλη αποδιάταξης
55° C για 30 sec		
95° C για 30 sec		

6.5.3 Υπολογισμοί

Οι μαθηματικές εξισώσεις που χρησιμοποιούνται στις περισσότερες μεθόδους για την ανάλυση των δεδομένων που λαμβάνονται από την Real Time PCR που προέρχονται από τη βασική φόρμουλα που περιγράφει την ενίσχυση PCR στην εκθετική φάση της αντίδρασης είναι η εξής:

$$X_n = X_0 \cdot (E+1)^n \quad (1)$$

όπου το X_n είναι ποσότητα του προϊόντος της PCR σε n κύκλους,

X_0 είναι η αρχική ποσότητα του εκμαγείου και

E είναι η απόδοση της αντίδρασης η οποία μπορεί να έχει τιμή μεταξύ 0 και 1.

Στην Real Time PCR που χρησιμοποιείται φθορισμός γίνεται δεκτό ότι η συσσώρευση του φθορισμού της χρωστικής αναφοράς είναι ανάλογη προς την συσσώρευση του προϊόντος ενίσχυσης της PCR και η εξίσωση (1) μπορεί να γραφεί

$$R_n = R_0 \cdot (E+1)^n \quad (2)$$

και ο αρχικός φθορισμός υπολογίζεται ως εξής:

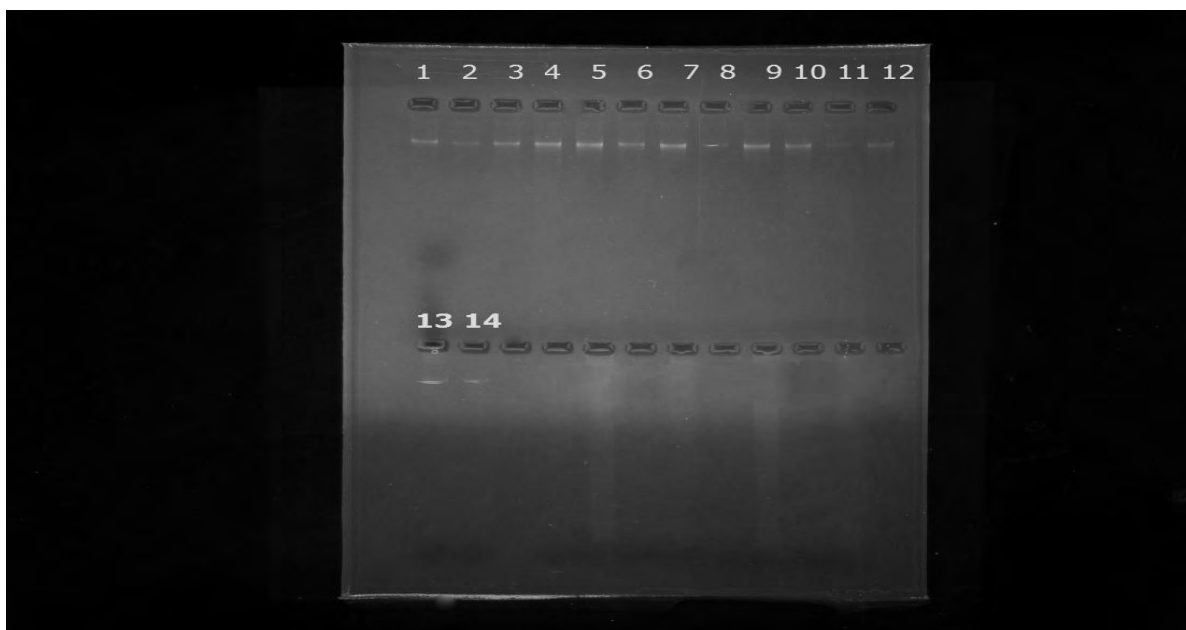
$$R_0 = R_n / (E+1)^n \quad (3)$$

η παράμετρος R_n είναι η ένταση του φθορισμού της χρωστικής αναφοράς σε κύκλο n , και η παράμετρος R_0 είναι το θεωρητικό σημείο έναρξης του φθορισμού το οποίο είναι ανάλογο προς την ποσότητα του αρχικού εκμαγείου. Έτσι, η τιμή R_0 αντιπροσωπεύει την ποσότητα στόχου που εκφράζεται σε αυθαίρετες μονάδες φθορισμού.

7. Αποτελέσματα

7.1 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση το DNA έγινε με την διαδικασία που έχει αναφερθεί στο προηγούμενο κεφάλαιο και ο έλεγχος των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Στην Εικόνα 18 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της απομόνωσης σε πήκτωμα αγαρόζης.



Εικόνα 18. Απομόνωση DNA από δείγματα τυριού Φέτα (1-13) και κατσικίσιου τυριού (14).

Η ένταση της φωτεινότητας και το πάχος κάθε ζώνης αποτελούν ένδειξη της ποσότητας του DNA που απομονώθηκε. Η ποσότητα που απομονώθηκε κρίθηκε ικανοποιητική για όλα τα δείγματα, οπότε προχωρήσαμε στην PCR.

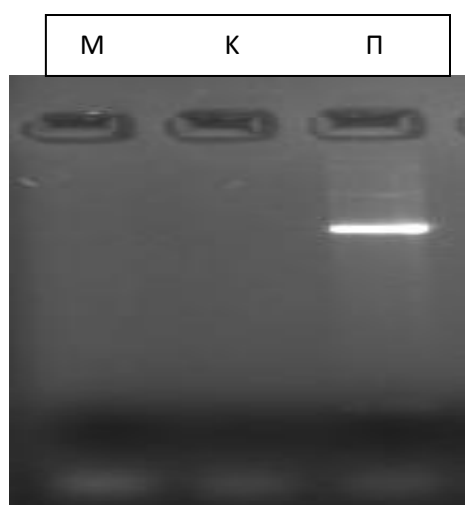
7.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η αντίδραση της PCR με σκοπό να εξακριβωθεί η εξειδίκευση των εκκινητών σε συγκεκριμένη ακολουθία 12S rRNA του mtDNA πρόβειου και να αποκλειστεί η περίπτωση της διασταυρούμενης ενίσχυσης σε ακολουθίες από άλλα είδη ζώων.

Μετά τον διαχωρισμό των τμημάτων του DNA, το προϊόν της PCR ανιχνεύθηκε σε πηκτή αγαρόζης 2%.

Στην συνέχεια με την μέθοδο PCR πολλαπλασιάσαμε τμήμα του γονιδίου 12s rRNA του μιτοχονδρίου για όλα τα δείγματα και έγινε έλεγχος αν το τμήμα αυτό πολλαπλασιάζει αλληλουχίες άλλων ειδών. Στα προϊόντα της PCR έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% με παράλληλη παρουσία DNA ladder, για έλεγχο της ενίσχυσης του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου 12s rRNA και για εκτίμηση του μεγέθους του προϊόντος της PCR. Στην Εικόνα 19 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ενίσχυσης του γονιδίου 12s rRNA σε

διαφορετικά είδη ζώων, όπου παρατηρούμε ότι οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε πολλαπλασιάζουν αλληλουχίες DNA προβάτου και καμία άλλη αλληλουχία DNA από τα άλλα είδη.



Εικόνα 19. Gel ηλεκτροφόρησης. (M=μοσχάρι, K=κατσίκι, Π=πρόβατο)

Όπως έχει αναφερθεί ο σκοπός της εργασίας είναι η δημιουργία καμπύλης αναφοράς με την μέθοδο της Real Time PCR και την χρήση χρωστικής SYBR Green. Για να επιτευχθεί ο σκοπός αυτός ήταν απαραίτητο να ακολουθήσουμε τα παρακάτω στάδια.

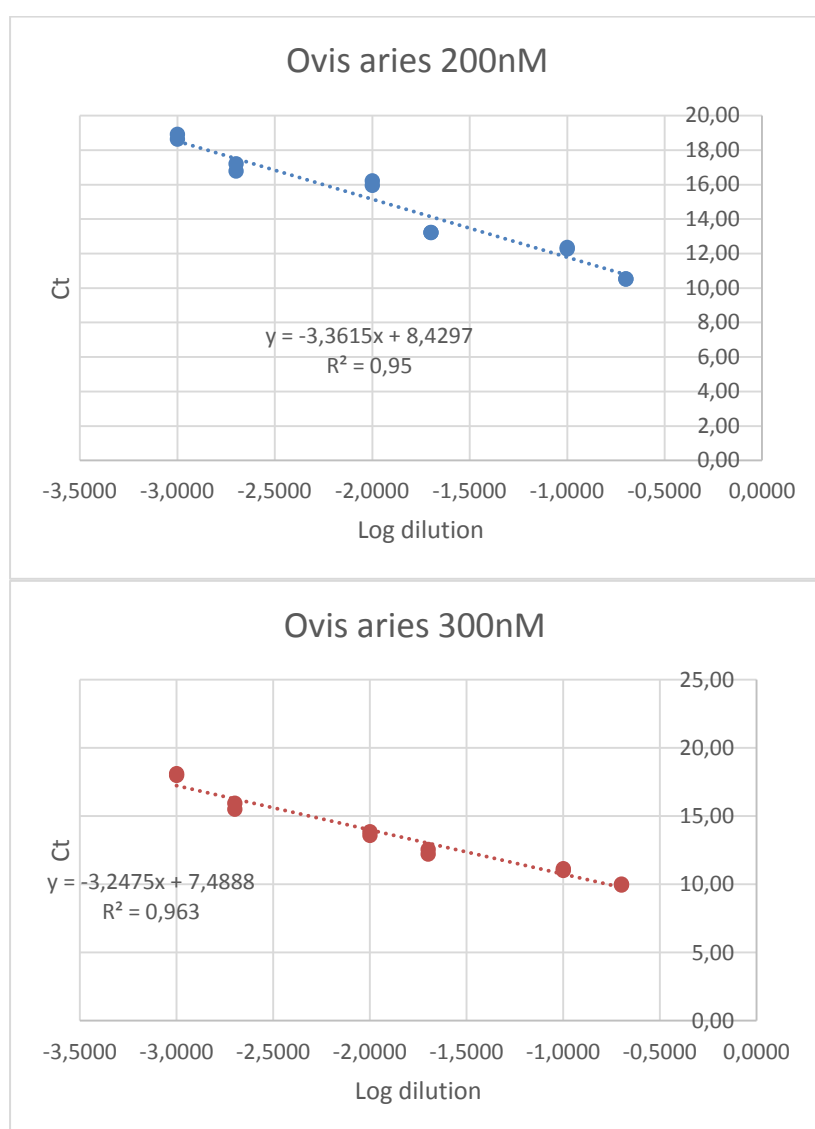
7.3 Έλεγχος συγκέντρωσης εκκινητών (Fw, Rv).

Πρώτα έπρεπε να ελεγχθεί ποια θα ήταν η επιθυμητή συγκέντρωση εκκινητών (Fw, Rv) και η οποία θα μας έδινε και την καλύτερη απόδοση αντίδρασης. Γι' αυτόν τον λόγο δημιουργήθηκαν δύο αντιδράσεις ξεχωριστά στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις σε διαδοχικές αραιώσεις 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000 δείγματος DNA πρόβειου κρέατος. Οι εκκινητές (Fw, Rv) είχαν συγκέντρωση 200 nM και 300 nM. Ο σχεδιασμός καμπύλης απόδοσης της αντίδρασης (άξονας $y=Ct$, άξονας $x=\log$ αραιώσης) έδειξε ότι η απόδοση της αντίδρασης είναι σταθερή ($R^2 \approx 1$) στο εύρος των αραιώσεων που χρησιμοποιήθηκε (Διάγραμμα 1) και τα στοιχεία της δίνονται στον Πίνακα 15. Από την κλίση της καμπύλης υπολογίσαμε την απόδοση της αντίδρασης σύμφωνα με την εξίσωση 6.5.1.

Πίνακας 16. Χαρακτηριστικά καμπυλών απόδοσης σε αντιδράσεις με δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις εκκινητών σε διαδοχικές αραιώσεις πρόβειου DNA

Είδος	Συγκέντρωση εκκινητών	R ²	Σημείο τομής (intercept)	slope κλίση	efficiency απόδοση
Πρόβειο	200 nM	0.9500	8.430	-3.3615	0.9837
Πρόβειο	300 nM	0.963	7.4888	-3.2475	1.0320

Στον Πίνακα 16 παρατηρούμε τη βέλτιστη απόδοση της αντίδρασης σε συγκέντρωση εκκινητών 300 nM, η οποία και επιλέχθηκε για να συνεχίσουμε την υπόλοιπη πειραματική πορεία.



Διάγραμμα 1. Καμπύλες αναφοράς της αντίδρασης Real Time PCR με χρωστική SYBR Green για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των εκκινητών.

7.4 Έλεγχος για διασταυρούμενη αντιδραστικότητα

Χρησιμοποιώντας την συγκέντρωση εκκινητών η οποία μας έδωσε την καλύτερη απόδοση αντίδρασης (300 nM) έγινε έλεγχος για την διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ των ειδών πρόβειου, χοιρινού, βοδινού, αίγειου, κοτόπουλου και γαλοπούλας. Συγκεκριμένα ο έλεγχος έγινε με εκκινητές πρόβειου που χρησιμοποιήθηκαν στα υπόλοιπα πέντε είδη για να ελέγξουμε αν πολλαπλασιάζουν την αλληλουχίες των ειδών αυτών. Ο έλεγχος έγινε με την μέθοδο της Real Time PCR χρησιμοποιώντας την χρωστική SYBR Green. Παρασκευάστηκε η αντίδραση του Πίνακα 12 και για δείγμα χρησιμοποιήθηκε DNA από πρόβειο, αίγιο, χοιρινό, μοσχάρι, κοτόπουλο και γαλοπούλα σε ποσότητα 3μl. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στον Πίνακα 16.

Πίνακας 17. Αποτελέσματα Ct με εκκινητές πρόβειου (300 nM) σε DNA από μοσχάρι, αίγιο, κοτόπουλο, γαλοπούλα

DNA	Εκκινητές πρόβειου (300 nM), Ct
Πρόβειο	10,40
	11,03
Αίγιο	27,39
	27,30
Χοιρινό	30,34
	30,04
Μοσχάρι	26,64
	26,54
Κοτόπουλο	26,45
	26,36
Γαλοπούλα	27,58
	27,25

Από τα δεδομένα του Πίνακα 17 Εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι εκκινητές του πρόβειου δεν ανιχνεύουν καθόλου DNA άλλων ειδών, κάτι που μας δίνει το δικαίωμα να συνεχίσουμε το πείραμα με τους συγκεκριμένους εκκινητές χωρίς να έχουμε το πρόβλημα της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας.

7.5 Έλεγχος χρησιμοποίησης αγελαδινού γάλακτος

Έγινε έλεγχος αν χρησιμοποιήθηκε αγελαδινό γάλα στην παρασκευή του τυριού Φέτα. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Real time PCR με SYBR με συστατικά διαλύματος που προαναφέρθηκαν στον πίνακα 14. Τα δείγματα 1-13 ήταν τυρί Φέτα, το 14 κατσικίσιο τυρί άλμης, το 15 ήταν θετικός μάρτυρας (DNA από βόειο κρέας) και το 16 ήταν αρνητικός μάρτυρας. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στον Πίνακα 18. Ερμηνεύοντας τα αποτελέσματα διαπιστώνουμε ότι δεν χρησιμοποιήθηκε αγελαδινό γάλα κατά την παρασκευή των τυριών Φέτα όπως και για την παρασκευή κατσικίσιου τυριού.

Πίνακας 18. Αποτελέσματα της Real time PCR με SYBR για ανίχνευση χρήσης αγελαδινού γάλακτος

Well	Well Type	Threshold (dR)	Ct (dR)
G5	feta1	6709,027	27,88
G6	feta2	6709,027	27,37
G7	feta3	6709,027	27,86
G8	feta4	6709,027	27,45
G9	feta5	6709,027	27,76
G10	feta6	6709,027	27,19
G11	feta7	6709,027	27,28
G12	feta8	6709,027	27,12
H5	feta9	6709,027	27,44
H6	feta10	6709,027	27,43
H7	feta11	6709,027	26,61
H8	feta12	6709,027	27,32
H9	feta13	6709,027	26,93
H10	goat cheese14	6709,027	26,88
H11	SYBR Positive Control	6709,027	13,98
H12	NTC	6709,027	27,25

7.6 Έλεγχος της συγκέντρωσης εκκινητών σε μίγματα

Το επόμενο βήμα ήταν γίνει έλεγχος της απόδοσης της αντίδρασης με εκκινητές που είχαν συγκέντρωση 200 nM, 300 nM σε μίγματα κατσικίσιου και πρόβειου. Μετά την απομόνωση του DNA από κρέας προβάτου (*Ovis aries*) και αίγας (*Capra prisca*) για τις ανάγκες της εργασίας δημιουργήσαμε αναμείξεις και των δύο ειδών. Τα μείγματα αυτά περιείχαν τα δύο είδη σε διάφορες αναλογίες. Οι αναλογίες επιλέχθηκαν έτσι ώστε να καλυφθούν όσο το δυνατόν περισσότεροι συνδυασμοί. Στον Πίνακα 19 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα μείγματα DNA (Πρόβατο, Αίγας) που δημιουργήθηκαν σε διαφορετικές αναλογίες. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε ήταν η Real Time PCR με χρωστική SYBR Green.

Πίνακας 19. Αναμείξεις των δύο ζωικών ειδών DNA (προβάτου - αίγα) σε διάφορες ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν

A/A Μείγματος	Πρόβατο	Αίγα	A/A Μείγματος	Πρόβατο	Αίγα
1	100mg	0mg	7	40mg	60mg
2	95mg	5mg	8	20mg	80mg
3	90mg	10mg	9	10mg	90mg
4	80mg	20mg	10	5mg	95mg
5	60mg	40mg	11	0mg	100mg
6	50mg	50mg			

Στόχος αυτού του πειράματος ήταν να ελεγχθεί η συγκέντρωση των εκκινητών που εξασφάλιζε τη βέλτιστη απόδοση ενίσχυσης του πρόβειου DNA σε μίγματα. Γι' αυτόν τον λόγο ελέγχθηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις εκκινητών *Ovis*, 200nM και 300nM, σε διαδοχικές αραιώσεις 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000 μίγματος DNA αίγας και προβάτου (1:1) με τη μέθοδο της Real-Time PCR και την χρωστική SYBR Green. Ο

σχεδιασμός καμπύλης απόδοσης της αντίδρασης (άξονας $y=Ct$, άξονας $x=\log$ αραιώσης) έδειξε ότι η απόδοση της αντίδρασης είναι σταθερή ($R^2 \approx 1$) στο εύρος των αραιώσεων που χρησιμοποιήθηκε και τα στοιχεία της δίνονται στον Πίνακα 20. Από την κλίση της καμπύλης υπολογίσαμε την απόδοση της αντίδρασης σύμφωνα με την εξίσωση 6.5.1.

Πίνακας 20. Χαρακτηριστικά καμπυλών απόδοσης σε αντιδράσεις με δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις εκκινητών σε διαδοχικές αραιώσεις μίγματος DNA αίγας και προβάτου (1:1)

Είδος	Συγκέντρωση εκκινητών	R^2	Σημείο τομής (intercept)	slope κλίση	efficiency απόδοση
Μίγμα	200 nM	0,9500	8,430	-3,3456	0,9902
Μίγμα	300 nM	0,9630	7,488	-3,3232	0,9995

Η απόδοση της αντίδρασης $E = 0.9995$ σε συνδυασμό με τον πολύ καλό συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0,9630$ μας επιτρέπουν να χρησιμοποιήσουμε τους εκκινητές με συγκέντρωση 300 nM για το τελικό στάδιο του πειράματος μας δηλαδή για την ποσοτικοποίηση του DNA σε δείγματα.

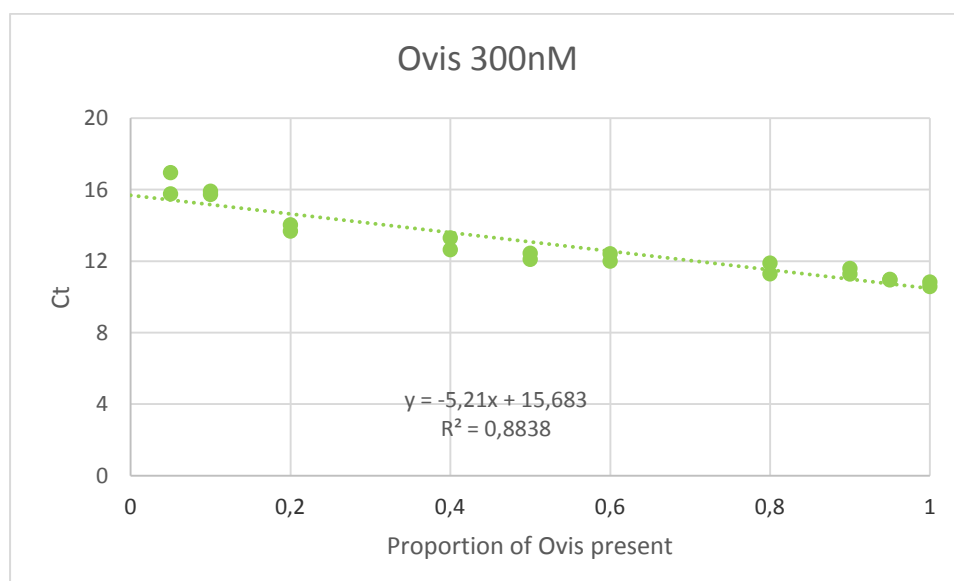
7.7 Κατασκευή καμπύλης ποσοτικοποίησης πρόβειου DNA

Για την κατασκευή της καμπύλης ποσοτικοποίησης πρόβειου DNA σε άγνωστα δείγματα αξιοποιήθηκε η σειρά μειγμάτων που παρασκευάστηκε από αίγιο και πρόβιο DNA (Πίνακας 19). Η συγκέντρωση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε ήταν 300 nM που εξασφάλιζε τη βέλτιστη απόδοση σε δείγματα μιγμάτων. Από αυτό το στάδιο καθορίστηκε και μια σταθερή τιμή $Threshold=2000$, η οποία θα χρησιμοποιείται και για όλους τους προσδιορισμούς σε άγνωστα δείγματα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Πίνακα 21. Χρησιμοποιώντας τις τιμές Ct και την απόδοση της αντίδρασης E , υπολογίστηκε το αρχικό επίπεδο φθορισμού R_0 , σύμφωνα με την εξίσωση 6.5.3.

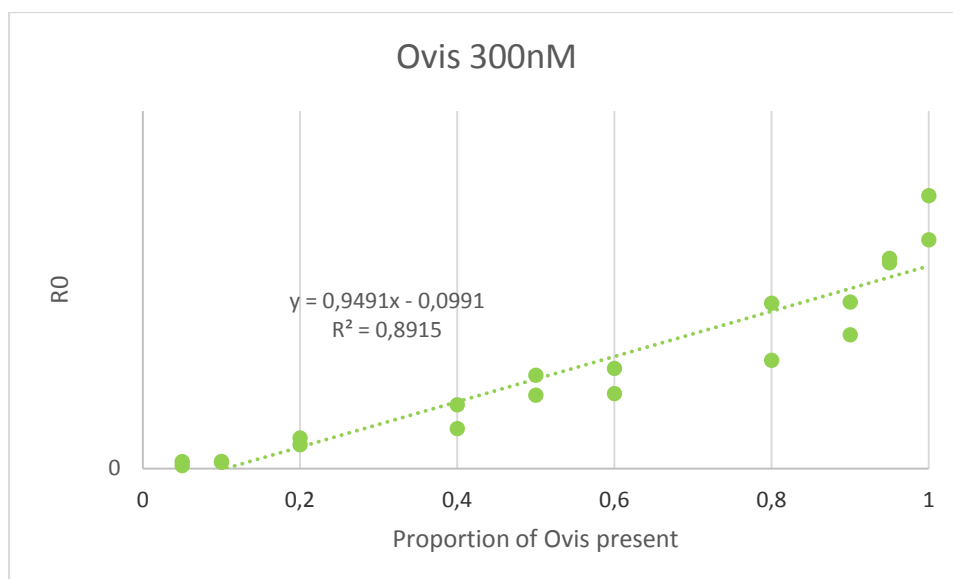
Πίνακας 21. Αποτελέσματα Ct και φθορισμού (R0) ανίχνευσης πρόβειου DNA με ειδικούς εκκινητές (300nM) σε διαφορετικά μίγματα Αίγιου και Πρόβειου

Ποσοστό	Ct	R0
0,00	26,34	
0,00	26,31	
0,05	15,76	0,030
0,05	16,95	0,013
0,10	15,73	0,030
0,10	15,91	0,027
0,20	13,68	0,128
0,20	14,03	0,100
0,40	13,30	0,168
0,40	12,64	0,268
0,50	12,10	0,392
0,50	12,44	0,308
0,60	12,00	0,420
0,60	12,41	0,315
0,80	11,29	0,694
0,80	11,89	0,454
0,90	11,28	0,699
0,90	11,59	0,561
0,95	10,98	0,863
0,95	10,95	0,882
1	10,58	1,145
1	10,83	0,960

Από τα δεδομένα του Πίνακα 21 δημιουργήσαμε δύο διαγράμματα:



Διάγραμμα 2. Καμπύλη ποσοτικοποίησης πρόβειου DNA σε μίγματα σύμφωνα με τιμές Ct.



Διάγραμμα 3. Καμπύλη ποσοτικοποίησης πρόβειου DNA σε μίγματα σύμφωνα με τιμές R0.

Το Διάγραμμα 2 έχει στον άξονα y τους αριθμούς Ct και στον άξονα x την το ποσοστό πρόβειου DNA που είναι παρών στο δείγμα, ενώ το Διάγραμμα 3 έχει στον άξονα y τα επίπεδα φθορισμού R0. Οι συντελεστές συσχέτισης R^2 υποδεικνύουν ότι και στις δύο περιπτώσεις οι καμπύλες ποσοτικοποίησης είναι γραμμικές, όπως είναι επιθυμητό. Η καμπύλη αναφοράς φθορισμού δίνει μεγαλύτερο συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0.8915$ από την καμπύλη αναφοράς των τιμών Ct $R^2 = 0.8838$.

Το γενικό συμπέρασμα των αποτελεσμάτων είναι ότι η ποσοτικοποίηση του DNA με βάση τις τιμές φθορισμού μας δίνει πιο ακριβή αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση με τιμές Ct (Threshold cycle) και προκρίνεται για χρήση στην ποσοτικοποίηση άγνωστων δειγμάτων.

7.8 Ποσοτικοποίηση δειγμάτων DNA από τυρί ΦΕΤΑ και κατσικίσιο τυρί

Από το Διάγραμμα 3 προκύπτει ότι η εξίσωση για την ποσοτικοποίηση πρόβειου DNA σε άγνωστα δείγματα είναι η ακόλουθη:

$$\text{Ποσοστό πρόβειου DNA (\%)} = (R0 + 0.0991) / 0.9491 \times 100$$

Στη συνέχεια τα εμπορικά δείγματα φέτας εξετάστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν με βάση αυτή την εξίσωση (Πίνακας 22).

Πίνακας 22. Αποτελέσματα Ct και φθορισμού (R0) ανίχνευσης πρόβειου DNA με ειδικούς εκκινητές (300nM) σε δείγματα φέτας

Δείγματα	Ct	R0	Ποσοστό πρόβειου DNA (%)
Φέτα ΧΩΡΙΟ	11.34	0.7741	92.0
Φέτα Carrefour	11.32	0.7750	92.1
Φέτα Μαίναλο	11.29	0.7779	92.4
Φέτα Μικρά Τυροκομεία	11.33	0.7760	92.2
Φέτα ΜΕΒΓΑΛ	11.32	0.7769	92.3
Φέτα ΗΠΕΙΡΟΣ	11.33	0.7760	92.2
Φέτα Λεβέτη Βαρελίσια	11.34	0.7763	92.2
Φέτα ΧΩΡΙΟ βιολογική	11.35	0.7759	92.2
Φέτα Όλυμπος	11.32	0.7769	92.3
Φέτα ΚΑΣΤΟΡΙΑΣ	11.45	0.7722	91.8
Φέτα ΔΩΔΩΝΗ	11.43	0.7731	91.9
Φέτα Mr Grand	11.32	0.7769	92.3
Delfi Greek feta	10.99	0.7788	92.5
Κατσικίσιο	11.32	0.7769	92.3
Negative	No Ct		

8. Συζήτηση

Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν μέρος της καθημερινής διαίτας του ανθρώπου σε όλη την διάρκεια της ζωής του. Λόγω της συνεχούς βελτίωσης του επιπέδου ζωής, της οικονομικής και κοινωνικής ανάπτυξης τόσο στις αναπτυσσόμενες όσο και στις αναπτυγμένες χώρες η κατανάλωσή τους αναμένεται να αυξηθεί σημαντικά τα προσεχή χρόνια.

Στην Ελλάδα το τυρί με την μεγαλύτερη παραγωγή είναι η Φέτα και η ετήσια κατανάλωσή της ξεπερνάει τα 10 κιλά ανά κάτοικο. Η Φέτα είναι ένα τρόφιμο γνωστό σε παγκόσμιο επίπεδο με συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση η οποία σε πολλές περιπτώσεις δεν μπορεί να καλυφθεί από την εγχώρια παραγωγή. Είναι τρόφιμο άριστης θρεπτικής αξίας και πηγή υψηλής ποιότητας θρεπτικών συστατικών. Ανήκει στα μαλακά τυριά και συγκεκριμένα στα λευκά τυριά άλμης. Έχει αναγνωριστεί ως προϊόν Π.Ο.Π. και η νομοθεσία καθορίζει τις πρώτες ύλες που προστίθενται για την παρασκευή της όσο και την τεχνολογία παραγωγής της. Το γάλα που χρησιμοποιείται για την παρασκευή είναι μίγμα αιγοπρόβειου γάλακτος με την συμμετοχή του αίγιου να μην ξεπερνάει το 30%. Το γεγονός ότι υπάρχει εποχιακή διακύμανση στην παραγωγή του πρόβειου γάλακτος, το πρόβειο γάλα είναι ακριβότερο από τα γάλατα άλλων ειδών ζώων και η υψηλότερη τιμή διάθεσης της Φέτας σε σχέση με τα υπόλοιπα λευκά τυρά άλμης, οδηγεί σε μη σωστές πρακτικές παρασκευής όπως προσθήκη γάλακτος άλλου είδους ζώου ή σε διαφορετικές αναλογίες από τις νομοθετικά οριζόμενες με σκοπό την μείωση του κόστους παραγωγής και συνεπώς το υψηλότερο κέρδος. Η παραπάνω πρακτική έχει ως αποτέλεσμα την νοθεία του προϊόντος, την εξαπάτηση των καταναλωτών με πιθανόν δυσάρεστα αποτελέσματα για την υγεία τους, τον μη υγιή ανταγωνισμό και τελικά την δυσφήμιση του ίδιου του προϊόντος. Επίσης λόγω της φήμης της στην παγκόσμια αγορά υπάρχουν πολλά λευκά τυριά άλμης, που αποτελούν απομιμήσεις της και παρασκευάζονται κυρίως από αγελαδινό γάλα ή από αναμίξεις γάλακτος διαφορετικών ειδών ζώων. Έτσι κρίθηκε απαραίτητη η θέσπιση νομοθετικού πλαισίου για να διασφαλιστεί η ποιότητα και η γνησιότητα της Φέτας σε όλα τα στάδια παραγωγής και εμπορίας της με σκοπό την προστασία του καταναλωτή αλλά του υγιούς ανταγωνισμού (νομοθεσία για τα προϊόντα Π.Ο.Π. και χορήγηση αριθμού ΦΕ). Αρχικά η προσπάθεια εστιάστηκε στην χρήση της επισήμανσης και της ιχνηλασιμότητας του γάλακτος με σκοπό να ελεγχθεί η αυθεντικότητα χωρίς όμως να μπορέσει να εξαλείψει τα φαινόμενα νοθείας. Έτσι κρίθηκε απαραίτητο η υιοθέτηση και ανάπτυξη αξιόπιστων αναλυτικών μεθόδων με στόχο τον έλεγχο της νοθείας και την ταυτοποίηση της Φέτας.

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν μοριακές τεχνικές με σκοπό την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση του πρόβειου γάλακτος και ανίχνευση της προσθήκης αγελαδινού γάλακτος σε δείγματα τυριού Φέτα και σε κατσικίσιο τυρί. Στόχος ήταν να διαπιστωθεί αν τα δείγματα τυριού Φέτας πληρούσαν τις προδιαγραφές που θέτει η νομοθεσία σχετικά με το ποσοστό του πρόβειου γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε καθώς και αν χρησιμοποιήθηκε αγελαδινό γάλα κατά την παρασκευή τους, με την χρήση μοριακών δεικτών και συγκεκριμένα γονιδίων. Η διαδικασία στηρίχτηκε στο μιτοχονδριακό γονίδιο 12S rRNA. Το κωδικοποιημένο γονίδιο 12S rRNA του mit DNA επιλέχτηκε ως γονίδιο στόχος, λόγω της υψηλής μεταβλητότητας μεταξύ των ειδών αλλά και λόγω των χαμηλών ορίων ανίχνευσης DNA που έχουν επιτευχθεί.

Στο παρελθόν έχει μελετηθεί η ποσοτικοποίηση DNA με την μέθοδο της Real Time PCR σε μίγματα γάλακτος διαφόρων ειδών και σε διάφορα τυριά από πολλούς ερευνητές όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 2.4.4 της παρούσας εργασίας. Όμως στις περισσότερες

από αυτές δεν χρησιμοποιήθηκε ως γενετικός δείκτης το γονίδιο 12S rRNA, και μόνο σε μία χρησιμοποιήθηκε το συγκεκριμένο γονίδιο για την ποσοτικοποίηση DNA σε τυρί Φέτα.

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια ανάπτυξης ενός πρωτοκόλλου ανάλυσης, βασιζόμενο στο μιτοχονδριακό γονίδιο 12S rRNA.

Με τη μέθοδο της απομόνωσης λάβαμε αρκετά μεγάλη ποσότητα ενιαίου mtDNA από μικρή ποσότητα τυριού Φέτα και κατσικίσιου τυριού. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι αρκετά συντηρημένο μεταξύ των ειδών δίνοντας έτσι την δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου γενικούς εκκινητές (universal primers). Η χρήση των universal primers απλοποιεί κατά πολύ την εφαρμογή της τεχνικής της PCR και της Real Time PCR.

Αρχικά με την μέθοδο της PCR πολλαπλασιάσαμε τμήμα του γονιδίου 12S rRNA του μιτοχονδρίου για όλα τα δείγματα και διαπιστώσαμε ότι οι εκκινητές πρόβειου δεν πολλαπλασιάζουν αλληλουχίες άλλων ειδών.

Έπειτα χρησιμοποιήσαμε την τεχνική της Real Time PCR για την ποσοτικοποίηση των αλληλουχιών DNA στο δείγμα. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος με χρήση χρωστικών που παρεμβάλλονται μεταξύ ζευγών βάσεων σε δίκλωνο DNA, SYBR Green.

Χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο Real Time PCR με χρήση χρωστικής SYBR Green, ώστε αφενός να γίνει έλεγχος της καταλληλότερης συγκέντρωσης των εκκινητών και αφετέρου για την δημιουργία καμπύλης αναφοράς η οποία θα μας έδινε καλύτερη απόδοση αντίδρασης (Efficiency, E) και μεγαλύτερο συντελεστή συσχέτισης. Καταλήξαμε ότι η βέλτιστη συγκέντρωση εκκινητών η οποία μας έδινε και την καλύτερη απόδοση ($E=1,0320$), ήταν 300 nM. Με την μέθοδο αυτή έγινε επίσης έλεγχος για την διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ DNA αίγιου, γαλοπούλας, κοτόπουλου, χοιρινού, μοσχαριού, όπου διαπιστώσαμε ότι οι εκκινητές προβάτου δεν ανιχνεύουν σε καμία περίπτωση DNA από τα άλλα πέντε είδη.

Χρησιμοποιώντας την απόδοση της αντίδρασης που πήραμε από την καμπύλη αναφοράς με SYBR Green προχωρήσαμε στην δημιουργία καμπυλών αναφοράς για την ποσοτικοποίηση του DNA των δειγμάτων. Χρησιμοποιώντας τις τιμές Ct, την τιμή της απόδοσης της αντίδρασης που αναφέραμε παραπάνω, και τον φθορισμό που παράγουν τα αρχικά επίπεδα DNA στο δείγμα δημιουργήσαμε δύο διαφορετικές καμπύλες αναφοράς. Η πρώτη καμπύλη αναφοράς δημιουργήθηκε από τις τιμές Ct και από το ποσοστό πρόβειου DNA στο δείγμα και η δεύτερη από τα αρχικά επίπεδα φθορισμού και το ποσοστό πρόβειου DNA στο δείγμα. Συγκρίνοντας τους συντελεστές συσχέτισης των δύο παραπάνω καμπυλών καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η καμπύλη αναφοράς φθορισμού ($R^2=0,8915$) έχει μεγαλύτερο συντελεστή συσχέτισης ($R^2=0,8915$) και αυτή θα χρησιμοποιηθεί για πιο αξιόπιστες ποσοτικές εκτιμήσεις των άγνωστων δειγμάτων ως προς το ποσοστό πρόβειου DNA.

Από την καμπύλη αναφοράς φθορισμού προέκυψε η εξίσωση που αναφέρεται στην παράγραφο 7.8, για την ποσοτικοποίηση του πρόβειου DNA σε άγνωστα δείγματα, η οποία εφαρμόστηκε σε εμπορικά δείγματα τυριού ΦΕΤΑ για την ποσοτικοποίησή τους σε πρόβειο DNA. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν εφαρμόζοντας την παραπάνω εξίσωση βρέθηκε ότι το ποσοστό πρόβειου DNA (%) στα εμπορικά δείγματα τυριού ΦΕΤΑ που εξετάστηκαν κυμαίνονταν από 91,8 το κατώτερο έως 92,5 το ανώτερο. Συνεπώς όλα τα δείγματα τυριού ΦΕΤΑ που εξετάστηκαν πληρούσαν τις απαιτήσεις της νομοθεσίας ως προς το ποσοστό πρόβειου γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή τους.

Όσο αφορά το ποσοστό του πρόβειου DNA (%) που ποσοτικοποιήθηκε στο κατσικίσιο τυρί και βρέθηκε 92,3% προκύπτει ότι το συγκεκριμένο τυρί είναι μη κανονικό

ως προς την επισήμανσή του (αναφέρει πρόβειο γάλα έως 20%) και συνεπώς δεν πρόκειται για κατσικίσιο τυρί αλλά για λευκό τυρί άλμης από αιγοπρόβειο γάλα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι για το συγκεκριμένο προϊόν δεν τίθεται θέμα νοθείας που αποσκοπεί σε οικονομικό όφελος γιατί η τιμή του κατσικίσιου γάλακτος είναι χαμηλότερη από αυτή του πρόβειου αλλά τίθεται θέμα παραπλάνησης του καταναλωτή. Συγκεκριμένη ομάδα καταναλωτών επιλέγουν την αγορά του κατσικίσιου τυριού για λόγους υγείας, οργανοληπτικούς αλλά και διαφορετικής κουλτούρας. Το κατσικίσιο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα που παράγονται από αυτό έχουν μία σειρά από πλεονεκτήματα:

- Οι πρωτεΐνες είναι υψηλής βιολογικής αξίας, υψηλής βιοδιαθεσιμότητας (Olalla et al. 2009, López-Aliaga et al. 2003, Ramos Morales et al. 2005) και δεν προκαλούν αλλεργία. Χαρακτηριστικό του είναι η πολύ μικρή περιεκτικότητα σε AS1-καζεΐνη στην οποία αποδίδεται και η υποαλλεργική του ιδιότητα (Haenlein 2004, Kondyli et al. 2007, Küçükçetin et al. 2011, Silanikove et al. 2010, Vargas et al. 2008, Gomes et al. 2013, Domagala 2009, Slaćanac et al. 2010). Επίσης περιέχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε μη πρωτεϊνικό άζωτο (Küçükçetin et al. 2011, Domagala 2009).
- Έχει υψηλή συγκέντρωση έξι από το δέκα απαραίτητα αμινοξέα (Haenlein 2004, Posati et al. 1976, Park 1994).
- Το προφίλ των λιπαρών οξέων του ενδείκνυται για αντιχοληστερινική διαίτα (Park 1994, Jandal 1996) και συνεπώς για πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων. Το μικρότερο μέγεθος των λιποσφαιρίων και η έλλειψη αγλυκίνης από την μεμβράνη τους το κάνει φυσικώς ομογενοποιημένο και του προσδίνει καλύτερη πεπτικότητα. Σε αυτό συμβάλει και ότι περιέχει αυξημένη συγκέντρωση μικρής και μεσαίας αλυσίδας λιπαρά οξέα.
- Η δομή των λιπαρών οξέων και των πρωτεϊνών του ευνοεί τον σχηματισμό μαλακού και εύθραυστου πήγματος κατά την πήξη του γάλακτος με αποτέλεσμα να έχει καλύτερη πεπτικότητα (Haenlein 2004, Remeuf et al. 1993).
- Περιέχει υψηλή περιεκτικότητα σε CLA (Conjugated Linoleic Acid – συζευγμένο λινελαϊκό οξύ), που μπορεί να έχει ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία όπως προστασία από τον καρκίνο και σε αντιχοληστερινική διαίτα (Huth et al. 2006).
- Η συγκέντρωση αλάτων ασβεστίου, φωσφόρου, μαγνησίου και χλωρίου είναι υψηλή.
- Έχει μικρότερη συγκέντρωση λακτόζης οπότε είναι κατάλληλο για άτομα που παρουσιάζουν τροφική υπερευαισθησία και τροφική δυσανεξία στη λακτόζη (Jenness 1980, Haenlein et al. 1984, Guo et al. 1984, Guo 2003).

Στην Ελλάδα έχουν βρεθεί μη συμμορφούμενα με την νομοθεσία γαλακτοκομικά προϊόντα σε δειγματοληψίες που γίνονται στα πλαίσια εφαρμογής του Πολυετούς Ολοκληρωμένου Εθνικού Σχεδίου Ελέγχων (Π.Ο.Ε.Σ.Ε) και δημοσιεύει ο Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων (Ε.Φ.Ε.Τ.) σε ετήσιες εκθέσεις. Οι δειγματοληψίες αυτές αφορούσαν μεταξύ άλλων τόσο τον έλεγχο της σύνθεσης του γαλακτοκομικού προϊόντος όσο και την επισήμανση και παρουσίασή του και τα αποτελέσματα των δειγματοληψιών εμφανίζονται στον Πίνακα 23. Επίσης στα πλαίσια του ίδιου προγράμματος έχουν γίνει δειγματοληψίες και σε τυριά Π.Ο.Π. και έχουν βρεθεί μη συμμορφούμενα με την νομοθεσία προϊόντα. Συγκεκριμένα το 2008 σε 115 δείγματα βρέθηκε ένα μη συμμορφούμενο προϊόν, το 2009 σε 99 δείγματα βρέθηκαν 2, το 2010 σε 10 δείγματα βρέθηκε 1, το 2011 βρέθηκαν 83, το

2012 βρέθηκαν 68 ενώ το 2013 βρέθηκαν 28 μη συμμορφούμενα γαλακτοκομικά Π.Ο.Π. προϊόντα.

Πίνακας 23. Αποτελέσματα ελέγχων Π.Ο.Ε.Σ.Ε. που αφορούν γαλακτοκομικά προϊόντα.

Έτος	Δείγματα που λήφθηκαν	Μη συμμορφούμενα δείγματα όσο αφορά:	
		Σύνθεση	Επισήμανση και παρουσίαση
2007	811	33	45
2008	2898	45	43
2009	790	9	15
2010	192	0	3
2011	738	4	2
2012	212	18	0
2013	186	28	0

Επίσης στην παρούσα εργασία έγινε έλεγχος αν χρησιμοποιήθηκε αγελαδινό γάλα κατά την παρασκευή του τυριού ΦΕΤΑ. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Real-Time PCR με χρήση χρωστικής SYBR Green. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν διαπιστώθηκε ότι δεν χρησιμοποιήθηκε αγελαδινό γάλα κατά την παρασκευή των συγκεκριμένων δειγμάτων τυριού ΦΕΤΑ.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H.L., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Poe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J.H., Standen R., Young I.G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.

Andréasson, H., Gyllensten, U., & Allen, M. (2002). Real-time DNA quantification of nuclear and mitochondrial DNA in forensic analysis. *Bio Techniques*, 33, 402–411.

Anifantakis E.M. (1986). Comparison of the physico-chemical properties of ewe's and cow's milk. Proceedings of the International Dairy Federation Seminar on Production and Utilization of Ewe's and Goat's Milk. Athens, Greece, 23-25 September 1985. Bulletin of the International Dairy Federation No 202/1986 42-53.

Anifantakis E.M. (1990). Manufacture of sheep's milk products. Proceedings of the XXIII International Dairy Congress, Montreal, Quebec B, 4 12-9.

Asensio, L., Gonzalez, I., Garcia, T., Martin, R. (2008), Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *Food Control* 19, 1-8.

Attardi, G., Chomyn, M.P., King, B., Kruse, B., Polosa, P.L., Murdter, N.N. (1989). Regulation of mitochondrial gene expression in mammalian cells. *Biochem. Soc. Trans.* 18:509-513.

Awadalla, P., Eyre-Walker, A., Smith, J.M. (1999). Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA. *Science* 286:2524-2525.

Bania, J., Ugorski, M., Polanowski, A. and Adamczyk, E. (2001) Application of polymerase chain reaction for detection of goats' milk adulteration by milk of cow. *J. Dairy Res.*, 68, 333-336

Beraiter-Hann J., Voth M. 1994. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microscopy Research Techniques* 27: 198-219.

Berg J., Tymoczko J. and Stryer L., 2002. "Biochemistry, 5th edition". W.H. Freeman and Company, New York. Section 27.2 and 27.2.4.

Bibb MJ., Vanetten RA., Wright CT., Walberg MW., Clayton DA. 1981. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell*. 26:167-180.

Borkova, M. and Snaselova, J. (2005) Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products – a review. *Czech J. Food Sci.*, 23, 41-50

Botstein, D., K. L. White, M. Skolnick and R. W. Davis, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.

Bottero, M. T., Civera, T., Anastasio, A., Turi, R. M., & Rosati, S. (2002), Identification of cows' milk in "buffalo" cheese by duplex polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*, 65, 362–366

- Bottero, M. T., Civera, T., Nucera, D., Rosati, S., Sacchi, P., and Turi, R. M. (2003) A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows', goats' and sheep's milk in dairy products. *International Dairy Journal*, 13, 277-282
- Bramanti, E., Sortino, C., Onor, M., Beni, F. and Raspi, G. (2003) Separation and determination of denatured α s1-, α s2-, β - and κ -caseins by hydrophobic interaction chromatography in cows', ewes' and goats' milk, milk mixtures and cheeses. *Journal of Chromatography A*, 994, 59-74.
- Branciari, R., Nijman, I. J., Plas, M. E., Di Antonio, E., & Lenstra, J. A. (2000). Species origin of milk in Italian mozzarella and Greek feta cheese. *Journal of Food Protection*, 63, 408–411.
- Brown, W.M., George, M., Wilson, A.C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1967-1971.
- Cattaneo, T. M. P., Nigro, F. and Greppi, G. F. (1996) Analysis of cow, goat and ewe milk mixtures by capillary zone electrophoresis (CZE): preliminary approach. *Milchwissenschaft*, 51, 616-619
- Cheng, Y.-H., Chen, S.-D. and Weng, C.-F. (2006) Investigation of goats' milk adulteration with cows' milk by PCR. *Asian-australasian journal of animal sciences*, 19, 1503-1507
- Casu S. and Marcialis A. (1966). Contribution to the knowledge of the relationship between milk composition and yield of Pecorino Romano cheese. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia* 17,2-213.
- Chapman H.R. (1981). Standardization of milk for cheesemaking at research level. *Journal of the Society of Dairy Technology* 34, 147-52.
- Chiappini, B., Brambilla, G., Agrimi, U., Vaccari, A., Aarts, A., Berben, G., et al. (2005). Real-time polymerase chain reaction approach for quantitation of ruminant-specific DNA to indicate a correlation between DNA amount and meat and bone meal heat treatments. *Journal of AOAC International*, 88, 1399–1403.
- Chien A., Edgar D.B., Trela J.M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bact.* 174: 1550–1557.
- Clayton D.A. 1992. Structure and function of the mitochondrial genome. *Journal of Inherited Metabolic Diseases* 15:439-447.
- Colak, H., Aydin, A., Nazli, B., Ergun, O. (2006), Detection of presence of cow's milk in sheep's cheeses by immunochromatography, *Food control* 17, 905-908
- Dalmaso, A., Fontanella, E., Piatti, P., S., & Bottero, M. T. (2004). A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Molecular and Cellular Probes*, 18, 81-87
- Di Pinto A, Conversano NC, Forte CT, Novello L, Tantillo GM (2004). Detection of cow milk in buffalo Mozzarella by polymerase chain reaction (PCR) assay. *J Food Qual* 27:428-435
- Díaz, I. L.-C., González Alonso, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P., García Lacarra, T. and Martín de Santos, R. (2007) Application of a polymerase chain reaction to detect adulteration of ovine cheeses with caprine milk. *Eur. Food Res. Technol.*, 225, 345-349.

Dooley J., Paine K., Garrett S., Brown H. (2004). Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Science*, 68, 431–438.

Fajardo, V., González, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P. E., García, T., et al. (2008a). Differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic swine (*Sus scrofa domestica*) meats by PCR analysis targeting the mitochondrial D-loop and the nuclear melanocortin receptor 1 (MC1R) genes. *Meat Science*, 78, 314–322.

Fajardo, V., González, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P. E., García, T., et al. (2008b). Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures. *Meat Science*, 79, 289–298.

Fajardo, V., González, I., Rojas, M., García, T., Martín, R. (2010). A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meat from game animal species. *Trend in Food Science & Technology*, 21, 408–421.

Fariyah Liyana, K., Shuhaimi, M., Che Man, Y. B., Sazili, A. Q., Aida, A. A., & Raha, A. R. (2009). Porcine specific real-time polymerase chain reaction (PCR) for Halal verification. Proceeding paper presented at the 3rd IMT-GT International Symposium on Halal Science and Management, 21–22 December 2009, pp. 24–28, KLIA Sepang, Selangor, Malaysia.

Feligini, M., Bonizzi, I., Curic, V. C., Rarma, P., Greppi, G. F. and Enne, G. (2005) Detection of Adulteration in Italian Mozzarella Cheese Using Mitochondrial DNA Templates as Biomarkers. *Food Technol. Biotechnol.*, 43, 91-95.

Fraga D., Meulia T. and Fenster S., (2008). “Real Time PCR”. John Wiley & Sons, Inc. Current Protocols Essential Laboratory Techniques. Unit 10.3., 1-34.

Gefrides, L., & Welch, K. (2011). Forensic biology: Serology and DNA. In A. Mozayani, & C. Noziglia (Eds.), *The forensic laboratory handbook procedures and practice* (pp. 16–49). (2nd ed.). London: Humana Press.

Girish, P. S., Anjaneyulu, A. S. R., Viswas, K. N., Anand, M., Rajkumar, N., Shivakumar, B. M., et al. (2004). Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Science*, 65, 757-763.

Grappin, R., Dupont, D., Pochet, S., Lefier, D. (2004), *Milk Proteins/Analytical Methods*, Encyclopedia of Dairy Sciences, 1967-1976.

Gray, M.W. (1989). Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5:25-50.

Gupta M., Chyi Y.S., Romero-Severson J. and Owen, J.L., 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor Appl Genet* 89: 998-1006.

Gyllensten U, Wharton D, Josefsson A, Wilson AC. (1991). Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice *Nature*, 352(6332):255-7.

Hayashi J.I., Tagashira Y., Yoshida M.C. 1985. Absence of extensive recombination between interspecies and intraspecies mitochondrial DNA in mammalian cells. *Experimental Cell Research* 160: 387-395.

Haza A. I., Morales P., Martin R., Garcia T., Anguita G, Sanz B. and Hernandez P.E. (1999). Detection and quantification of goat's cheese in ewe's cheese using a monoclonal antibody and two ELISA formats. *J. Sci. Food Agric.*, 79, 1043-1047.

Helling RB, Goodman HM., Boyer HW. 1974. Analysis of endonuclease R EcoRI fragments of DNA from Lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J. Virol.* 14:1235-1244.

Herman, L. (2001). Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. *Journal of Dairy Research*, 68, 429–436.

Hoarau, G., Holla, S., Lescasse, R., Stam, W.T., Olsen, J.L. (2002). Heteroplasmy and evidence for recombination in the mitochondrial control region of the flatfish *Platichthys flesus*. *Mol. Biol. Evol.* 19:2261-2264.

Houghton S. and Cockerill F., 2006. "RealTime PCR: Overview and applications". *Surgery*, Vol 139, No 1, Σελ. 1- 5.

Hunt M., 2006. "Real Time PCR Tutorial". University of South Carolina.

Izco, J. M., Ordóñez, A. I., Torre, P. and Barcina, Y. (1999) Validation of capillary electrophoresis in the analysis of ewe's milk casein. *Journal of Chromatography A*, 832, 239-246

Jacob, H. J., Lindpaintner, K., Lincoln, S. E., Kusumi, K., Bunker, R. K., Mao, Yi-Pei, Ganten, D. Dzau, V. J. and Lander, E. S., 1991. Genetic mapping of a gene causing hypertensive rat. *Cell* 67: 213-224.

Jenness, R. (1974). The composition of milk (In "Lactation" Vol. III. pp 3-101, B. L. Larson and V. R. Smith ed. Acad. Press. London).

Johansen S., Guddal P.H., Johansen T. 1990. Organization of the mitochondrial genome of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Nucleic Acids Research*. 18: 411-419.

Johnson, A. H. (1974). The composition of milk. (In "fundamentals of dairy chemistry", 2nd edition pp 1-57, B.H. Webb, A. H. Johnson, and J. A. Alford, ed. . Avi Publ. Co. Westport Conn.).

Kaminarides, S. E. and Anifantakis, E. M. (1993) Comparative study of the separation of casein from bovine, ovine and caprine milks using HPLC. *Journal of Dairy Research*, 60, 495-504

Kaminarides, S. E., Kandarakis, J. G. Moschopoulou, E. (1995) Detection of bovine milk in ovine Halloumi cheese by electrophoresis of α s1-casein. *Australian Journal of Dairy Technology*, 50, 58-61

Kaminarides, S. E. and Koukiassa, P. (2002) Detection of bovine milk in ovine yoghurt by electrophoresis of para- κ -casein. *Food Chemistry*, 78, 56-55.

Kesmen, Z., Gulluce, A., Sahin, F., Yetim, H. (2009). Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. *Meat Science*, 82, 444–449.

Klotz, A. and Einspanier, R. (2001) Development of a DNA-based screening method to detect cow milk in ewe, goat and buffalo milk and dairy products using PCR-LCR-EIA-technique. *Milchwissenschaft*, 56, 67–70.

- Kondo, R., Sotta, Y., Matrura, E.T., Ishiwa, H., Takahata, N., Chigusa, S.I. (1990). Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Genetics* 126:657-663.
- Kortbaoui, R., Locas, A., Imbeau, M., Payment, P., Villemur, R. (2009). Universal mitochondrial PCR combined with species-specific dot-blot assay as a source-tracking method of human, bovine, chicken, ovine, and porcine in fecal-contaminated surface water. *Water Research*, 43, 2001–2010.
- Kotowicz, M., Adamczyk, E. and Bania, J. (2007) Application of a duplex-PCR for detection of cows' milk in goats' milk. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 14, 215-218.
- Kvist, L. (2000). Phylogeny and phylogeography of European Parids (pp. 51). Oulu, Finland: University of Oulu.
- Lagoudakis, E. D., Zouros, E. (2001). Direct evidence for homologous recombination in the Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution* 18: 1168-1175.
- Lakshmipathy, U., Campbell, C. (1999). The human DNA ligase III gene encodes nuclear and mitochondrial proteins. *Moll. Cell. Biol.* 19:3869-3876.
- Landegren U., Nilsson M., Kwok P.-Y., 1998. Reading bits of genetic information: Methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome Res.* 8:769–776.
- Lanzilao I, Burgalassi F, Fancelli S, Settimelli M, Fani R (2005). Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial cytb gene from species of dairy interest. *J AOAC Int* 88:128-135.
- Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang SY, Landre PA, Abramson RD, Gelfand DH. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of fulllength *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl.* 1993; 2:275-87.
- Lee, W.J., Conroy, J., Howell, W.H., Kocher, T.D. (1995). Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *J. Mol. Evol.* 41:54-66.
- Lenstra, J. A. (2010). Detection of adulterations: Identification of animal species. In L. M. L. Nollet, & F. Toldrá (Eds.), *Safety Analysis of Foods of Animal Origin* (pp. 601–617). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Livak K. J. and Schmittgen T. D., 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DDC T Method". Elsevier, Methods, USA. Vol 25, p. 402-408.
- López-Andreo M., Garrido-Pertierra, A., & Puyet, A. (2006). Evaluation of post-polymerase chain reaction melting temperature analysis for meat species identification in mixed DNA samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3978–3973.
- López-Andreo M., Lugo, L., Garrido-Pertierra, A., Prieto, M. I., & Puyet, A. (2005). Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 339, 73–82.

López-Calleja, I., Alonso, I. G., Fajardo, V., Rodríguez, M. A., Hernández, P. E., García, T. and Martín, R. (2005a) PCR detection of cows' milk in water buffalo milk and mozzarella cheese. *International Dairy Journal*, 15, 1122-1129

López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P. E., García, T. and Martín, R. (2005b) Application of Polymerase Chain Reaction to Detect adulteration of Sheep's Milk with Goats' Milk. *J. Dairy Sci.*, 88, 3115-3120

Lopez-Calleja, I., Gonzalez, I., Fajardo, V., Hernandez, P., Garcia, T., Martin, R. (2007), Application of an indirect ELISA and a PCR technique for detection of cows' milk in sheep's and goats' milk cheeses. *International Dairy Journal* 17, 87–93

López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P. E., García, T. and Martín, R. (2007a) Quantitative detection of goats' milk in sheep's milk by real-time PCR. *Food Control*, 18, 1466-1473

López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P. E., García, T. and Martín, R. (2007b) Real-time TaqMan PCR for quantitative detection of cows' milk in ewes' milk mixtures. *International Dairy Journal*, 17, 729-736

López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Rodríguez, M. A., Hernández, P. E., García, T. and Martín, R. (2004) Rapid Detection of Cows' Milk in Sheeps' and Goats' Milk by a Species-Specific Polymerase Chain Reaction Technique. *J. Dairy Sci.*, 87, 2839-2845

Lopparelli RM, Cardazzo B, Balzan S, Giaccone V, Novelli E (2007). Real time Taqman polymerase chain reaction detection and quantification of cow DNA in pure water buffalo Mozzarella cheese: Method validation and its application on commercial samples. *J Agric Food Chem* 55:3429-3434

Mafra, I, Ferreira, I. M. P. L. V. O., Faria, M. A., and Oliveira, B. P. P. (2004) A Novel Approach to the Quantification of Bovine Milk in Ovine Cheeses Using a Duplex Polymerase Chain Reaction Method. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4943-4947

Mafra, I., Ferreira, I. M. P. L. V. O. and Oliveira, M. B. P. P. (2008) Food authentication by PCR-based methods. *Eur. Food Res. Technol.*, 227, 649-665

Mafra, I., Roxo, A., Ferreira, I. and Oliveira, M. B. (2007) A duplex polymerase chain reaction for the quantitative detection of cows' milk in goats' milk cheese. *International Dairy Journal*, 17, 1132-1138.

Magoulas, A., Zouros, E. (1993). Restriction-Site heteroplasmy in Anchovy (*Engraulis encrasicolus*) indicates incidental biparental inheritance of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* 10:319-325.

Martín, I., García, T., Fajardo, V., Rojas, M., Pegels, N., Hernández, P. E., et al. (2009). SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs. *Meat Science*, 82, 252–259.

Maudet, C. and Taberlet, P. (2001) Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism. *Journal of Dairy Research*, 68, 229-235.

Maudet, C., & Taberlet, P. (2002). Holstein's milk detection in cheeses inferred from melanocortin receptor 1 (MC1R) gene polymorphism. *Journal of Dairy Science*, 85, 707–715.

Mayer, H. K. (2005) Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. *International Dairy Journal*, 15, 595-604

Mayer, W. and Hörtner, H. (1992) Discontinuous electrophoresis of B-caseins for the determination of bovine caseins in milk and dairy products. *Electrophoresis*, 13, 803-804.

Meusel, M.S., Moritz, R.F. (1993). Transfer of paternal mitochondrial DNA during fertilization of honeybee (*Apis mellifera* L.) eggs. *Curr. Genet.* 24:539-543.

Michaels G.S., Hauswirth W.W., Laipis P.J. 1982. Mitochondrial DNA copy number in bovine oocytes and somatic cells. *Developmental Biology* 94: 246-251.

Moatsou, G., Moschopoulou, E., Mollé, D., Gagnaire, V., Kandarakis, I. and Léonil, J. (2008) Comparative study of the protein fraction of goat milk from the Indigenous breed and from international breeds. *Food Chemistry*, 106, 509-520

Moatsou, G., and Anifantakis, E. (2003), Recent developments in antibody based analytical methods for the differentiation of milk from different species. *International Journal of Dairy Technology*, 56(3), 133–138

Moatsou, G., Samolada, M., Katsabeki, A. and Anifantakis, E. (2004) Casein fractions of ovine milk from indigenous Greek breeds. *Lait*, 84, 285-296

Moatsou, G., Vamvakaki, A.-N., Mollé, D., Anifantakis, E. and Léonil, J. (2006) Protein composition and polymorphism in the milk of Skopelos goats. *Lait*, 86, 345-357

Mohd Hazim, M. Y., Shuhaimi, M., Che Man, Y. B., Abdul, O., & Nur Fadhilah, K. M. (2012). Detection of raw pork targeting porcine-specific mitochondrial Cytochrome B gene by molecular beacon probe Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Food Analytical Methods*, 5, 422–429.

Molina, E., De Frutos, M. and Ramos, M. (2000) Capillary electrophoresis characterization of the casein fraction of cheeses made from cows', ewes' and goats' milk. *Journal of Dairy Research*, 67, 209-216

Molina, E., Martin-Álvarez, P. J. and Ramos, M. (1999) Analysis of cows', ewes' and goats' milk mixtures by capillary electrophoresis: quantification by multivariate regression analysis. *International Dairy Journal*, 9, 99-105

Moritz, C., Dowling, T.E., Brown, W.M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population Biology and Systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18:269-292.

Mullis K.B., Erlich H.A., Arnheim N., Horn G.T., Saiki R.K., and Scharf S.J., 1987. Process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences. U.S. Patent #4,683,195.

Pfaffl M.W., 2002. "Chapter 3: A-Z of quantitative PCR". S.A. Bustin. International University Line, La Jolla, CA. p. 1-23.

Plath, A., Krause, I. and Einspanier, R. (1997) Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, 205, 437-441

- Pulina G. (2004). Dairy sheep nutrition. CABI Publishing, 1-11.
- Pauline Ebing, Karin Rutgers (2006). Preparation of dairy products, Sixth Edition. Agromisa Foundation and CTA: 12, 15.
- Rea, S., Chikuni, K., Branciari, R., Sangamayya, R. S., Ranucci, D. and Avellini, P. (2001) Use of duplex polymerase chain reaction (duplex-PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella cheese. *Journal of Dairy Research*, 68, 689-698
- Recio, I., Garcia-Risco, M. R., Amigo, L., Molina, E., Ramos, M. and Martin Alvarez, P. J. (2004) Detection of Milk Mixtures in Halloumi Cheese. *J. Dairy Sci.*, 87, 1595-1600
- Recio, I., Pérez-Rodríguez, M.-L., Ramos, M. and Amigo, L. (1997) Capillary electrophoretic analysis of genetic variants of milk proteins from different species. *Journal of Chromatography A*, 768, 47-56
- Reineccius, G.A., T. E. Kavanagh, and P. G. Keeney, (1979). Identification and quantification of free neutral carbohydrate in milk products by gas - liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Dairy Sci.* 53: 3018.
- Robards, K., Haddad, P. R. and Jackson, P. E. (1994) Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods. Academic Press Inc., London, U.K., 305-379.
- Robin E.D., Wong R. 1988. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *Journal of Cell Physiology* 136: 507-513.
- Rojas, M., González, I., Pavón, M. A., Pegels, N., Lago, A., Hernández, P. E., et al. (2010). Novel TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for verifying the authenticity of meat and commercial meat products from game birds. *Food Contaminants and Additives*, 27, 749–763.
- Rokas, A., Ladoukakis, E., Zouros, E. (2003). Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends Ecol. Evol.* 18:411-417.
- Rojas, M., González, I., Pavón, M. A., Pegels, N., Lago, A., Hernández, P. E., et al. (2010). Novel TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for verifying the authenticity of meat and commercial meat products from game birds. *Food Contaminants and Additives*, 27, 749–763.
- Saccone, C., Pesole, G., Sbisà, E. (1991). The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: Structure-Function model and evolutionary pattern. *Journal of Molecular Evolution*, 33:83-91.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239:487-91.
- Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. 1989. Molecular Cloning – A laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor. Laboratory Press.
- Sampson H. A. (2003). Food allergy. *Journal of allergy and clinical immunology*, 111(2), 540-547.
- Santos, C. G., Melo, V. S., Amaral, J. S., Estevinho, L., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2012). Identification of hare meat by a species-specific marker of mitochondrial origin. *Meat Science*, 90, 836–841.

Sawyer, J., Wood, C., Shanahan, D., Gout, S., & McDowell, D. (2003). Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Control*, 14, 579–583.

Schwartz, M., Vissing, J. (2002). Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *New Engl. J Med.* 347:576-580.

Shattenstein B. and Ghadirian P. (1998). Influences on diet, health behaviours and their outcome in select ethnocultural and religious groups. *Nutrition*, 14, 223-230.

Skibinski, D.O., Gallagher, C., Beyton, C.M. (1994). Sex-limited mitochondrial DNA transmission in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Genetics* 138:801-809.

Stefos, G., Argyrokastritis, A., Bizelis, I., Moatsou, G., Anifantakis, E. and Rogdakis, E. (2004) Detection of bovine mitochondrial DNA specific sequences in Feta cheese and ovine yogurt by PCR-RFLP. *Milchwissenschaft*, 59, 509-511.

Storry J.E., Alistair S.G., Millard D., Owen A.J. and Ford G.D. (1983). Chemical composition and coagulating properties of renneted milks from different breeds and species of ruminants. *Journal of Dairy Research* 50, 215-29.

Stratagene, 2006. "Introduction to Quantitative PCR". Stratagene, La Jolla, CA. pp. 3-8, 9-11, 23-26.

Stratagene, 2007. "Mx Pro QPCR Software". Stratagene, La Jolla, CA. p 4-5, 231-236, 241-243.

VanGuilder H. D., Vrana K. E. and Freeman W. M., 2008. "Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis". *BioTechniques*.

Veloso, A. C. A., Teixeira, N. and Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2002) Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis. Detection of milk adulterations. *Journal of Chromatography A*, 967, 209-218

Veltri, K.L., Espiritu, M., Singh, G. (1990). Distinct genomic copy number in mitochondria of different mammalian organs. *J. Cell Physiol.* 143:160-164.

Volitaki, A. J. and Kaminarides, S. E. (2001) Detection of bovine milk in ovine Halloumi cheese by HPLC analysis of cheese caseins hydrolysed by plasmin. *Milchwisswnachft*, 56, 207-210.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M., 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407–4414.

Wan QH., Wu H., Fujihara T., Fang SG. 2004. Which genetic marker for conservation genetic issue? *Electrophoresis* 25: 2165-2176.

Welsh J., McClelland M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18: 7213–7218.

Williams J.F. (1989). Optimization strategies for the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 7: 762–769.

Williams J.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. and Tingey S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531–6535.

Wilson A.C., Cann R.L., Carr S.M., George M., Gyllenstein U.B., Helm-Bychowski K.M., Palumbi S.R., Prager E.M., Sage R.D., Stoneking M. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society* 26: 376-397.

Wong M. L. and Medrano J. F., 2005. “ Real Time PCR for m-RNA quantitation”. *Biotechniques*. Hillsborough. Vol 39, p 75-85.

Yang H. and Korban S.S., 1996. Screening apples for OPD20/600 using sequence-specific primers. *Theor. Appl. Genet.* 92: 263–266.

Zhang, C. L., Fowler, M. R., Scott, N. W., Lawson, G., & Slater, A. (2007). A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. *Food Control*, 18, 1149–1158.

Zhang DX., Hewitt G. 1997. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial primers in insects. *Insect. Mol. Biol.* 6:143-150.

Zhang DX., Hewitt G. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol. Ecol.* 12: 563-584.

Zhang, C. L., Fowler, M. R., Scott, N. W., Lawson, G., & Slater, A. (2007). A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. *Food Control*, 18, 1149–1158.

Zhao X., Li N., Guo W., Hu X., Liu Z., Gong G., Wang A., Feng J., Wu C. (2004). Further evidence for paternal inheritance of mitochondrial DNA in the sheep (*Ovis aries*). *Heredity* 93: 399–403.

Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-178.

Zouros, E., Freeman, K.R., Ball, A.O., Pogson, G.H. (1992). Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. *Nature*, 389(6394):412-4.

Zouros, E., Ball, A.O., Savedra, C., Freeman, K.R. (1994). An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proc. Natl. Acad. Science. USA* 91:7463-7467.

Ελληνική Βιβλιογραφία

Ανυφαντάκης Ε., (2004). Τυροκομία. Χημεία, Φυσικοχημεία, Μικροβιολογία. Εκδόσεις Σταμούλη. Σελ. 186-220.

Ανυφαντάκης, Ε. Μ., Καλατζόπουλος, Γ. Κ., Βουτσινάς, Λ. και Μασούρας, Θ. (1985) Μελέτη μεθόδων προσδιορισμού της νοθείας φέτας πρόβειου γάλακτος με αγελαδινό. Πρακτικά Πρώτου Πανελλήνιου Συνεδρίου Τροφίμων με θέμα «Σύγχρονη Τεχνολογία και Ποιοτικός Έλεγχος», 311-328

Απόφαση του Δικαστηρίου των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων στην Υπόθεση C-511/2003 της 20^{ης} Οκτωβρίου 2005. σελ. 1-19.

Διαμαντίδης Χρ. Γρηγόρης (1994). Εισαγωγή στη Βιοχημεία. Εκδόσεις University Studio Press. Θεσσαλονίκη.

Ετήσια έκθεση για το ΠΟΕΣΕ έτους 2007, Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, Υπουργείο Ανάπτυξης, Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων, 2007.

Ετήσια έκθεση για το ΠΟΕΣΕ έτους 2008, Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων, 2008.

Ετήσια έκθεση για το ΠΟΕΣΕ έτους 2009, Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων, 2009.

Ετήσια έκθεση για το ΠΟΕΣΕ έτους 2010, Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων, 2010.

Ετήσια έκθεση για το ΠΟΕΣΕ έτους 2011, Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων, 2011.

Ετήσια έκθεση για το ΠΟΕΣΕ έτους 2012, Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων, 2012.

Ετήσια έκθεση για το ΠΟΕΣΕ έτους 2013, Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων, 2013.

Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 2081/92 «για την προστασία των γεωγραφικών ενδείξεων και των ονομασιών προέλευσης των γεωργικών προϊόντων και των τροφίμων». ». Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων αριθ. L 208 της 24.7.1992.

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1107/96 «σχετικά με την καταχώρηση των γεωγραφικών ενδείξεων και των ονομασιών προέλευσης σύμφωνα με τη διαδικασία που προβλέπεται στο άρθρο 17 του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2081/92». Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων αριθ. L 148 της 21.6.1996.

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1070/1999 «για την τροποποίηση του παραρτήματος του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1107/96 σχετικά με την κατάχρηση των γεωγραφικών ενδείξεων και των ονομασιών προέλευσης σύμφωνα με τη διαδικασία που προβλέπεται στο άρθρο 17 του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2081/92». Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων L 130/18 της 26. 5. 1999.

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 178/2002 «για τον καθορισμό των γενικών αρχών και απαιτήσεων της νομοθεσίας για τα τρόφιμα, για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων και τον καθορισμό διαδικασιών σε θέματα ασφάλειας των τροφίμων». Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων αριθ. L 31, 01/02/2002, σελ. 1-11, 15, 19-20.

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1829/2002 «για την τροποποίηση του παραρτήματος του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1107/96 της Επιτροπής όσον αφορά την ονομασία "φέτα"». Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων αριθ. L 277, 15/10/2002, σελ. 10-14.

Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 1169/2011 «σχετικά με την παροχή πληροφοριών για τα τρόφιμα στους καταναλωτές, την τροποποίηση των κανονισμών του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου (ΕΚ) αριθ. 1924/2006 και (ΕΚ) αριθ. 1925/2006 και την κατάργηση της οδηγίας 87/250/ΕΟΚ της Επιτροπής, της οδηγίας 2000/12/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, των οδηγιών της Επιτροπής 2002/67/ΕΚ και 2008/3/ΕΚ και του Κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 608/2004 της Επιτροπής». Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων αριθ. L 304, 22/11/2011, σελ. 25-26, 28-35.

Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 1151/2012 «για τα συστήματα ποιότητας των γεωργικών προϊόντων και τροφίμων». Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης αριθ. L 343, 14/12/2012, σελ. 1-12.

Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 1255/1999 «περί κοινής οργάνωσης αγοράς στον τομέα του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων». Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης αριθ. L 160, 26/06/1999.

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 273/2008 «για τη θέσπιση λεπτομερών κανόνων εφαρμογής του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1255/1999 του Συμβουλίου, όσον αφορά τις μεθόδους ανάλυσης και ποιοτικής αξιολόγησης του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων». Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης αριθ. L 88, 29/03/2008, σελ. , και 53-61.

Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 668/2014 «για τη θέσπιση κανόνων εφαρμογής του Κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 1151/2012 όσο αφορά τον καθορισμό των ενωσιακών συμβόλων για τα συστήματα ποιότητας των γεωργικών προϊόντων και τροφίμων». Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης αριθ. L 179, 19/06/2014, σελ. 36-38, 54-60.

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 852/2004 «για την υγιεινή των τροφίμων». Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης αριθ. L 139, 30/04/2004, σελ. 7.

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 853/2004 «για καθορισμό ειδικών κανόνων υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης». Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης αριθ. L 139, 29/04/2004, σελ. 8-10, σελ. 21, σελ. 23-24.

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 931/2011 «σχετικά με τις απαιτήσεις ανιχνευσιμότητας που ορίζει ο Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 178/2002 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου για τρόφιμα ζωικής προέλευσης». Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης αριθ. L 242, 20/09/2011, σελ. 1-2.

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1935/2004 «σχετικά με τα υλικά και αντικείμενα που προορίζονται να έρθουν σε επαφή με τρόφιμα και με την κατάργηση των οδηγιών 80/590/ΕΟΚ και 89/109/ΕΟΚ». Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης αριθ. L 338, 13/11/2004.

Οδηγός Εφαρμογής των άρθρων 11, 12, 16, 17, 18, 19 & 20 του κανονισμού (ΕΚ) 178/2002 σχετικά με τη γενική νομοθεσία για τα τρόφιμα. Συμπεράσματα της μόνιμης επιτροπής για την τροφική αλυσίδα και την υγεία των ζώων. http://www.efet.gr/images/efet_res/docs/legislation/food-hygiene/apply_instructions.pdf

Κατσαούνης, Ν. (1979). Βοοτροφία σελ. 127-132. Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη Α.Ε. Θεσσαλονίκη.

ΚΥΑ αριθ. 261611/2007 «Καθορισμός συμπληρωματικών μέτρων για την εφαρμογή του Καν. (ΕΚ) 510/2006 του Συμβουλίου της 20^{ης} Μαρτίου 2006 «για την προστασία των γεωγραφικών ενδείξεων και των ονομασιών προέλευσης των γεωργικών προϊόντων και των τροφίμων» και του Καν. (ΕΚ) 1898/2006 της Επιτροπής της 23ης Δεκεμβρίου 2006 «σχετικά με τη θέσπιση λεπτομερών κανόνων εφαρμογής του κανονισμού υπ' αριθμ. 510/2006 για την προστασία των γεωγραφικών ενδείξεων και των ονομασιών προέλευσης των γεωργικών προϊόντων και των τροφίμων», ΦΕΚ 406/Β/22-03-2007.

ΚΥΑ αριθ. 290398/2008 «Τροποποίηση της υπ' αριθμ. 261611/7.3.2007 απόφασης των Υπουργών Εσωτερικών, Δημόσιας Διοίκησης και Αποκέντρωσης, Οικονομίας και Οικονομικών, Ανάπτυξης, Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, «περί καθορισμού συμπληρωματικών μέτρων για την εφαρμογή του καν. (ΕΚ) 510/2006 του Συμβουλίου της 20.3.2006 «για την προστασία των γεωγραφικών ενδείξεων και των ονομασιών προέλευσης των γεωργικών προϊόντων και των τροφίμων» και του καν. (ΕΚ) 1898/2006 της Επιτροπής της 23.12.2006 «σχετικά με τη θέσπιση λεπτομερών κανόνων εφαρμογής του υπ' αριθ. 510/2006 κανονισμού για την προστασία των γεωγραφικών ενδείξεων και των ονομασιών προέλευσης των γεωργικών προϊόντων και των τροφίμων» (ΦΕΚ 406/2007/Β), ΦΕΚ 694/Β/21-04-2008.

ΚΥΑ αριθ. 175180/2011 «Αντικατάσταση της υπ' αριθ. 296113/2006 (Β' 1414) Κοινής Υπουργικής Απόφασης με θέμα «Μέτρα για τον έλεγχο της παραγωγής, αξιοποίησης, μεταποίησης, τυποποίησης, διακίνησης και εμπορίας για το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα», ΦΕΚ 1721/Β/2-8-2011.

ΚΥΑ αριθ. 188763/2011 «Σύσταση Οργανισμού «ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ ΓΕΩΡΓΙΚΟΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ – ΔΗΜΗΤΡΑ» και συγχώνευση εποπτευόμενων από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων νομικών προσώπων», ΦΕΚ 2284/Β/13-10-2011.

Κώδικας τροφίμων και ποτών άρθρα 79, 80, 83.

Νόμος υπ' αριθ. 2127/1993 «Εναρμόνιση προς το κοινοτικό δίκαιο του φορολογικού καθεστώτος των πετρελαιοειδών προϊόντων, αλκοόλης και αλκοολούχων ποτών και βιομηχανοποιημένων καπνών και άλλες διατάξεις», άρθρο 94, ΦΕΚ 48/Α/6-4-1993.

Νόμος υπ' αριθ. 3698/2008 «Ρυθμίσεις θεμάτων κτηνοτροφίας και άλλες διατάξεις», ΦΕΚ 198/Α/2-10-2008

Υ.Α. αριθ. 313025 «Αναγνώριση προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης (Π.Ο.Π.) τυριού «ΦΕΤΑ» (FETA)», ΦΕΚ 8/Β/11-01-1994.

Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία - Ιστοσελίδες.

<http://curia.europa.eu/juris/showPdf.jsf?jsessionid=9ea7d2dc30db4edead5224454efba38b914777331e5e.e34KaxiLc3qMb40Rch0SaxqTc390?text=&docid=60654&pageIndex=0&doclang=EL&mode=doc&dir=&occ=first&part=1&cid=25775>